

**OPPORTUNISTA PATOGÉN *COCHLIOBOLUS* IZOLÁTUMOK
JELLEMZÉSE**

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

KRIZSÁN KRISZTINA

**TÉMAVEZETŐ:
DR. PAPP TAMÁS
EGYETEMI DOCENS**

BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA

**SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR
MIKROBIOLÓGIAI TANSZÉK**

**2012
SZEGED**

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS.....	4
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	6
2.1. A <i>Bipolaris</i> és <i>Curvularia</i> nemzetségek leírása és rendszerezésének alapjai.....	6
2.1.1. A <i>Cochliobolus</i> , <i>Bipolaris</i> és <i>Curvularia</i> nemzetségek leírása és nevezéktana..	6
2.1.2. A „ <i>Helminthosporium</i> ” komplexhez tartozó nemzetségek elkülönítésében alkalmazott morfológiai bélyegek.....	8
2.1.3. A <i>Cochliobolus</i> nemzetség rendszertani helyzetének tanulmányozása molekuláris módszerekkel	9
2.2. A <i>Cochliobolus</i> nemzetség tagjai a klinikumban	11
2.2.1. A nemzetség tagjai által okozott fertőzések.....	11
2.2.2. A humán kórokozó <i>Cochliobolus</i> fajok elkülönítése	13
2.2.3. A <i>Bipolaris</i> és <i>Curvularia</i> nemzetségek tagjainak antifungális szerekkel szembeni érzékenysége.....	15
2.2.4. Az extracelluláris enzimek termelésének szerepe a humán kórokozó gombák patogenitásában.....	19
2.3. A <i>Cochliobolus</i> nemzetség növénypatogén tagjainak és a termelt másodlagos-metabolitok általános jellemzése	20
2.3.1. A növénykórokozó <i>Cochliobolus</i> fajok célpontjai	20
2.3.2. A <i>Cochliobolus</i> fajok által termelt fontosabb másodlagos metabolitok és hatásaik.....	21
3. CÉLKITŰZÉSEK	26
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	27
4.1. A kísérletek során felhasznált törzsek.....	27
4.2. A kísérletek során használt táptalajok és tenyésztési körülmények	28
4.2.1. A törzsek fenntartására és szaporítására alkalmazott táptalajok.....	28
4.2.2. Az antimikrobiális tesztek során felhasznált tápközegek	28
4.2.3. A szénforráshasznosítás vizsgálat során alkalmazott táptalaj.....	29
4.2.4. Specifikus táptalajok az enzimaktivitások vizsgálatára.....	29
4.3. A kísérletek során használt primerek	29
4.4. A kísérletek során alkalmazott módszerek	30
4.4.1. Genomi DNS tisztítása	30
4.4.2. DNS gélelektroforézis.....	30
4.4.3. PCR-reakcióelegyek és amplifikálási körülmények.....	31
4.4.4. DNS izolálás agaróz gélből.....	33
4.4.5. A DNS szekvenciák meghatározása és elemzése	33
4.4.6. Fénymikroszkópos vizsgálatok	34
4.4.7. Antimikrobiális érzékenységi tesztek.	34
4.4.7.1. A tesztekben vizsgált antifungális szerek.....	34
4.4.7.2. Antifungális érzékenységi tesztek mikrotiter lemezen.....	35
4.4.7.3. Hatóanyag kombinációkkal szembeni érzékenység vizsgálata checkerboard titrálással.....	36
4.4.7.4. A hatóanyagok közötti kölcsönhatás mértékének kiszámítása	36
4.4.8. Szénforráshasznosítási vizsgálat.....	36

4.4.9. Extracelluláris enzimtermelés vizsgálata	37
4.4.10. Ophiobolin vegyületek elválasztása és tisztítása	37
4.4.11. Az ophiobolinok antifungális hatásának vizsgálata mikrotiter lemezen	38
4.4.12. Az ophiobolin vegyületek hatására bekövetkező apoptotikus jellegű morfológiai változások vizsgálata	38
5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	40
5.1. A humán kórokozó <i>Cochliobolus</i> fajok azonosításában használt morfológiai markerek vizsgálata	40
5.2. Humánpatogén <i>Bipolaris</i> fajok megkülönböztetésére alkalmas molekuláris karakterek azonosítása	45
5.2.1 A klinikumban jelentős <i>Bipolaris</i> fajok szekvencia-alapú azonosítása	45
5.2.2. A random amplifikált DNS-polimorfizmus módszerének alkalmazása a klinikai <i>Cochliobolus</i> izolátumok azonosítására	51
5.3. A klinikai mintákból származó <i>Bipolaris</i> törzsek filogenetikai analízise	52
5.4. A humán kórokozó <i>Cochliobolus</i> izolátumok szénforrás-hasznosítási spektruma	57
5.5. A humán kórokozó <i>Cochliobolus</i> izolátumok extracelluláris enzimtermelésének vizsgálata	61
5.6. A <i>Cochliobolus</i> izolátumok gombaellenes szerekkel szembeni érzékenységének vizsgálata	65
5.7. Antifungális hatású vegyületek kombinációinak vizsgálata <i>Cochliobolus</i> izolátumokkal szemben	71
5.8. A <i>Bipolaris</i> nemzetség tagjai által termelt ophiobolinok és azok antimikrobiális hatása	77
6. IRODALOMJEGYZÉK	83
7. ÖSSZEFOGLALÁS	100
8. SUMMARY	104
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	108
10. MELLÉKLETEK	109

1. BEVEZETÉS

Az Ascomycota-k Pleosporales rendjébe tartozó *Bipolaris* és *Curvularia* ivartalanul szaporodó, anamorf nemzetségek ivarosán szaporodó, teleomorf alakjait a *Cochliobolus* nemzetség foglalja magába. A nemzetségek általános ismertetőjegye a hajlott, bumeráng alakú ivartalan szaporítóképlet, a konídium képzése, illetve a gombafonalban és konídiumokban felhalmozódó sötétbarna színanyag, a melanin jelenléte, mely a környezeti stresszel szemben biztosít hatékony védelemet azáltal, hogy elősegíti a gomba sikeres fertőzését mind növényi, mind humán szervezetben. A XX. század első felében történt leírásuk után csak az 1970-es években indultak komolyabb kutatások a nemzetség növényeket fertőző képességével kapcsolatban, mely évről-évre jelentős gazdasági károkat okoz a mezőgazdaságban.

A *Bipolaris* és *Curvularia* nemzetségek egyes tagjai növénypatogenitásukon kívül a humán gyógyászatban „*phaeohyphomycosis*”-ként ismert, pigmentált gombák által okozott fertőzések egyik kiváltójaként is ismertek. A nemzetségek patogén tagjait a gombák által okozott allergiás orrmelléküreg-gyulladás (*allergic fungal sinusitis*) első számú, míg a fonalas gombák által okozott szaruhártyagyulladás (keratomikózis) harmadik számú kórokozóiként tartják számon. Emellett gyakran izolálhatók szubkután, ritkább esetben központi idegrendszeri fertőzésekben is. Klinikai azonosításuk során a konídiumok mérete és alakja a legfontosabb határozóbélyeg, ami azonban gyakran téves eredményhez vezet a szaporítóképletek környezeti körülményektől függő változatossága, illetve a fajok nagyfokú hasonlósága miatt. A konídiumok vizsgálatának megerősítéseként egyre gyakrabban alkalmazott molekuláris módszer a riboszómális DNS köztes átíródó elválasztó (*internal transcribed spacer*, ITS) régiójának elemzése, mely számos gomba fajsztípusú azonosítása során általánosan használt marker. Eredményeink alapján azonban elmondhatjuk, hogy a humán szaruhártyagyulladásból izolált *Bipolaris australiensis*, *B. hawaiiensis* és *B. spicifera* esetén ez a régió önmagában nem hordoz elegendő differenciáló karaktert a három faj elkülönítésére.

A dolgozat egyik célja a *Bipolaris* nemzetség opportunistá patogén tagjainak azonosításában alkalmazott morfológiai markerek alkalmazhatóságának felülvizsgálata és a fajok elkülönítésére alkalmas új molekuláris markerek feltérképezése volt. Emellett a molekuláris vizsgálatokban használt fehérjekódoló, illetve nem kódoló DNS-szakaszok szekvenciáit filogenetikai elemzésekbe is bevontuk, miután a *B. spicifera* és a *B. australiensis*

fajok sem morfológiai, sem molekuláris vizsgálatok segítségével nem voltak elkülöníthetők egymástól.

A másodlagos metabolit-spektrumok részletes vizsgálata során több szeszterterpenoid-típusú ophiobolin-analógot is találtak a *Bipolaris* nemzetség egyes tagjainál. Az ophiobolinok egyedi, 5-8-5 triciklusos szerkezettel és változatos biológiai aktivitással rendelkező vegyületcsoport. Közülük is kiemelkedik az ophiobolin A kalmodulin-gátló, apoptotikus, illetve antimikrobiális hatása révén. A dolgozat másik célja a vegyület antifungális hatásának jellemzése és hatásmechanizmusának feltérképezése volt.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A *Bipolaris* és *Curvularia* nemzetségek leírása és rendszerezésének alapjai

A *Bipolaris* és *Curvularia* nemzetségekbe tartozó ivartalanul, konídiumok segítségével szaporodó (anamorf) gombák az Ascomycota törzs Dothideomycetes osztályának Pleosporales rendjébe tartoznak. Mindkét nemzetség ivarosán, aszkospórák segítségével szaporodó (teleomorf) alakjait a *Cochliobolus* nemzetség foglalja magába. Az anamorf alakokhoz morfológiailag közel álló rokon nemzetségek a *Drechslera* (teleomorf: *Pyrenophora*) és az *Exserohilum* (teleomorf: *Setosphaeria*).

2.1.1. A *Cochliobolus*, *Bipolaris* és *Curvularia* nemzetségek leírása és nevezéktana

A *Cochliobolus*, *Bipolaris* és *Curvularia* nemzetségek besorolása és rendszertani helyzete nagyrészt tisztázott, azonban a rokon nemzetségek morfológiai hasonlóságából adódó azonosítási nehézségek és a következetlen névhasználat miatt sok tanulmányban még ma is zavaros nevezéktannal találkozhatunk. Erre jó példa a jelenleg *Bipolaris maydis* (Shoemaker 1959) néven ismert faj, melyet eredetileg *Ophiobolus heterostrophus*-ként írtak le (Drechsler 1925), de a későbbiekben átnevezték *Helminthosporium maydis*-nak (Drechsler 1925), majd *Drechslera maydis*-nak is (Subramanian és Jain 1966).

A ma *Bipolaris* nemzetséggént ismert csoportot elsőként Link írta le 1809-ben „*Helminthosporium*”-ként, majd Persoon (1822) kezdeményezésére az összes morfológiailag hasonló fajt átnevezték *Helminthosporium*-ra (Sivanesan 1987, Gaur és mtsi. 2006). A későbbiekben Nisikado (1929) munkássága alapján a *Helminthosporium* nemzetséget *Cylindro*- és *Eu-Helminthosporium* alnemzetségekre osztották fel. A *Cylindro-Helminthosporium* csoport tagjai egyenes, hengeres, a két vége felé elkeskenyedő vagy buzogány alakú konídiummal rendelkező fajok, melyek bármely konídiális sejtjükből egy vagy több csíratömlőt képezhetnek. Az *Eu-Helminthosporium* alnemzetség tagjainak konídiumai orsó alakúak, és vagy csak az egyik vagy mindkét sarki sejtjükből indulhat csíratömlő-növekedés (Nisikado 1929). Nem sokkal később Ito (1930) javaslata alapján a Nisikado-féle *Cylindro-Helminthosporium* alnemzetséghez tartozó fajokat *Drechslera* néven nemzetségi szintre emelték. Ezt követően Boedijn (1955) létrehozta a *Curvularia* nemzetséget, amelybe kiemelte a *Drechslera*-k közül a megduzzadt és sötétbarna központi sejtrel rendelkező, erősen hajlott konídiumú fajokat. Ezt követte az *Eu-Helminthosporium* alnemzetség felülvizsgálata, melynek eredményeként Shoemaker (1959) javaslatára létrehozták a *Bipolaris* nemzetséget. A későbbiekben Leonard és Suggs (1974) a hílum (a

konídiumon a konídióforról való leválás során képződő heg) morfológiája alapján elkülönítette a *Bipolaris* nemzetségből az *Exserohilum* fajokat, melyek jól láthatóan kiemelkedő hílumot hordoznak az orsó vagy buzogány alakú konídiumokon, csíratömlőt pedig az egyik vagy mindkét csúcsi sejtből képezhetnek. Összefoglalva, a *Helminthosporium* komplex tagjait négy nemzetségre osztották fel, nevezetesen a *Bipolaris*, *Drechslera*, *Exserohilum* és *Curvularia* nemzetségekre (Leonard és Suggs 1974).

A *Helminthosporium* fajok teleomorf alakját elsőként Riess említi *Ophiobolus* néven 1854-ben, mely nemzetség levélfoltosságot okozó aszkuszos fajokat foglalt magába. Az *Ophiobolus heterostrophus* faj leírása és jellemzése során Drechsler (1934) észrevette az *Ophiobolus* nemzetségen belüli zavarosságot, melynek oka, hogy egyes fajok anamorf alakjai *Phoma*-szerű konídiumképzést mutatnak, mások csíratömlő képzése szigorúan bipoláris, továbbá a nemzetség egyes tagjai nem is rendelkeznek anamorf alakokkal. Ezért a *Helminthosporium*-ok közé tartozó anamorf alakokkal rendelkező, helikoid aszkospórát képző növénypatogén fajok számára létrehozta a *Cochliobolus* nemzetséget. Ez a nemzetség a kezdetektől magába foglalta a ma *Bipolaris* és *Curvularia* néven ismert anamorf alakokat, így heterogén csoportot alkotva. A *Cochliobolus* nemzetség felosztása azonban máig vitatott kérdés: Alcorn (1983b) és Sivanesan (1987) szerint más nemzetségekhez (*Nectria*) hasonlóan itt is elfogadható a heterogenitás, míg Tsuda és munkatársai (1977) ragaszkodott a *Pseudocochliobolus* és *Cochliobolus* nemzetségek megkülönböztetéséhez. Az előbbire a *Cochliobolus*-okkal ellentétben jellemző a sztróma képzése, illetve az aszkospórák nem, vagy csak kevésbé csavarodnak fel az aszkuszban (Alcorn 1983a). A *Pseudocochliobolus* csoportban találhatók a kisebb méretű, kevesebb szeptumszámú konídiummal rendelkező *Bipolaris* fajok és a *Curvularia*-k; míg a *Cochliobolus*-okhoz a tipikus, sok szeptumos, egyenes vagy enyhén hajlott konídiumú *Bipolaris*-okat sorolták be (Tsuda és mtsi. 1977).

Az anamorf és teleomorf alakok közti kapcsolatokat tisztázását sürgeti az a törekvés, miszerint minden gombához egy egyedi név tartozzon (Hawksworth 2011). A *Cochliobolus* nemzetség esetében általánosan egy teleomorf és egy anamorf elnevezés létezik, amely valójában egy fajt jelöl. A nehézséget az okozza, hogy egyes *Cochliobolus* fajokhoz nem társíthatók anamorf alakok (Alcorn 1983b), illetve több anamorf alakról is tudunk, melyek nem rendelkeznek teleomorf formával (Sivanesan 1987, Gehlot és mtsi. 2010). Az Index Fungorum adatbázisban az 56 *Cochliobolus* faj közül csak 43 kapcsolható össze valamelyik anamorf alakkal, miközben 116 *Bipolaris* és 113 *Curvularia* faj van regisztrálva (Manamgoda és mtsi. 2011). Berbee és munkatársai (1999) szerint ezek az ivaros alakokkal nem rendelkező

Bipolaris és *Curvularia* fajok is a *Cochliobolus*-okkal közös ősrre vezethetők vissza, de pontos filogenetikai kapcsolataik még feltáratlanok (Manamgoda és mtsi. 2011).

2.1.2. A „*Helminthosporium*” komplexhez tartozó nemzetségek elkülönítésében alkalmazott morfológiai bélyegek

A négy rokon anamorf nemzetség átfogó, általános jellemzését és az elkülönítésükben fontos jellemzők meghatározását Alcorn (1983a) végezte el; míg a humán patogén *Drechslera*, *Bipolaris* és *Exserohilum* fajok elkülönítésére alkalmas bélyegeket McGinnis és munkatársai (1986) foglalták össze. Az általuk felsorolt határozóbélyegek a következők voltak: a csíratömlő képződésének és növekedésének iránya a konídium hosszanti tengelyéhez képest; a konídium alakja, szeptumainak száma és képződési sorrendje; illetve a hílum és a konidiofór alakja (**1. táblázat**).

1. táblázat. A négy rokon anamorf nemzetség, a *Drechslera*, *Bipolaris*, *Curvularia* és *Exserohilum* elkülönítésére ajánlott morfológiai jellegzetességek bemutatása egy-egy típustörzsön (Alcorn 1983a, Sivanesan 1987).

	<i>Drechslera tritici-repentis</i>	<i>Bipolaris maydis</i>	<i>Exserohilum turcicum</i>	<i>Curvularia lunata</i>
Csíratömlő képződése:	sarki és közbenső sejtekből	egyik vagy mindkét sarki sejtből	egyik vagy mindkét sarki sejtből	egyik vagy mindkét sarki sejtből
Csíratömlő növekedésének iránya:	oldalirányú, a konídium hosszanti tengelyével nagy szöget zár be	a konídium hosszanti tengelyével megegyező irányú, a hílumot eltolja	a konídium tengelyével szöget zár be, a hílumot jelentősen eltolja	a konídium hosszanti tengelyével szöget zár be
Konídium szeptumszáma:	3 vagy több	3 vagy több	3 vagy több	3-4
Konidiális válaszfalak képződése:	az első válaszfal kijelöli a konídium bazális sejtjét, a második medián, a harmadik disztálisan képződik	az első válaszfal szubmediális, alig észrevehető, a második a bazális sejtet jelöli ki, a harmadik a csúcsi részhez közel jön létre	az első válaszfal a bazális részhez, a második a csúcsi részhez közel, a harmadik mediálisan jön létre	az első válaszfal a medián vagy szubmedián, a második a bazális sejtet kijelölve, míg a harmadik disztálisan képződik
Hílummorfológia:	pitvar alakú, sötét színű, lekerekített régió határolja, lapos	az alatta levő bazális sejt csonka, két sötét színű, lencse alakú pont jelöli a pórus két oldalán, kiemelkedő	határozottan kiemelkedő, komplex, dupla falú struktúrával	kissé kiemelkedik, két egymáshoz közeli lencseszerű pontként látható
Konídium alakja:	egyenes, henger alakú, ritkán hajlott	fuzoid, hajlott	ellipszoid, fuziform	tojásdad, hajlott; az utolsó előtti sejt megvastagodott, sötétebb és vékonyabb falú
Konidiofór:	egyedül vagy kis csoportban, egyenes, nem elágazó, multiszeptált, cikk-cakk lefutású			

A képződő konídiumok számát, alakját, méretét és szeptálságát a tenyésztési közeg pH-ja, hőmérséklete, a nitrogén- és szénforrás típusa és koncentrációja, a relatív páratartalom, a fotoperiodicitás és a fény hullámhossza befolyásolja (Alcorn 1983a, McGinnis és mtsi. 1986). Ezek függvényében igen széles skálán változhatnak a konídiumok tulajdonságai, ami különösen a klinikai fajok azonosítása terén állítja nagy kihívás elé a mikrobiológusokat.

2.1.3. A *Cochliobolus* nemzetség rendszertani helyzetének tanulmányozása molekuláris módszerekkel

A morfológiai alapú rendszerezés problémáinak feloldására több szekvencia alapú tanulmány is született, melyek a *Cochliobolus*, illetve a *Bipolaris* és *Curvularia* nemzetségek filogenetikai vizsgálatával foglalkoznak.

Shimizu és munkatársai (1998) a melanin szintézisben szerepet játszó, két intront hordozó 1,3,8-trihidroxinaftalén-reduktáz gén (*Brn1*) összehasonlító elemzését használták fel a *Bipolaris* nemzetségen belüli filogenetikai kapcsolatok elemzésére. A vizsgálatokban minden *Bipolaris* faj jól körülhatárolt csoportot alkotott, így a gén alkalmasnak bizonyult mind intra-, mind interspecifikus variabilitás vizsgálatára. A legnagyobb valószínűség (*maximum likelihood*) és a szomszédok egyesítésének elve (*neighbor-joining*) alapján végzett filogenetikai vizsgálat a nagy és közepes méretű konídiummal rendelkező *B. sorokiniana* és *B. maydis* izolátumok, továbbá a buzogány alakú, egyik vége felé elkeskenyedő konídiumot képző *B. kusanoi* és *B. nodulosa* izolátumok egy közös csoportot alkottak, mely megfeleltethető a *Cochliobolus*-ok (Drechsler) csoportjának. A kisméretű konídiumot képző *B. australiensis* és *B. coicis* izolátumok egy másik, a *Pseudocochliobolus* teleomorf alakoknak (Tsuda és mtsi. 1977) megfeleltethető csoportot alkottak. A *Brn1* gén elemzésére alapozott vizsgálatok a Tsuda és munkatársai (1977) által javasolt *Cochliobolus* és *Pseudocochliobolus* felosztást erősítették meg (Shimizu és mtsi. 1998).

A *Cochliobolus* nemzetség filogenetikai viszonyait Berbee és munkatársai (1999) a sejtmagi riboszómális RNS-t kódoló komplex köztes átíródnak elválasztó régiójának (ITS) és a glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz gén (*gpd*) egy szakaszának nukleotid szekvenciáira alapozott legnagyobb valószínűség, a szomszédok egyesítése és a legnagyobb takarékoság (*maximum parsimony*) elvek alapján végzett elemzések segítségével térképezték fel. A vizsgálatok alapján a monofiletikus *Cochliobolus* 1 csoportot többségében a nagyon virulens növényi kórokozó fajok alkotják. A csoportot alkotó fajok közül a *Co. victoriae* nem tekinthető monofiletikusnak, mivel egyes izolátumoknál hiányoznak a *Co. carbonum*-tól elkülönítő karakterek a *gpd* génben. Emellett a növénypatogenitás szempontjából nem

jelentős *Co. eleusines* a súlyos károkat okozó *Co. sativus*, míg a szintén nem virulens *Co. peregrinensis* a jelentős növénypatogén *Co. miyabeanus* testvércsoportját alkotja. A *Cochliobolus* 2 csoport szintén monofiletikusnak bizonyult az ITS és *gpd* szakaszokat külön-külön, illetve ITS/*gpd* kombinált adatsorként elemezve is. A *Cochliobolus* 2 csoportot vegyesen alkotják a *Curvularia* és *Bipolaris* anamorf alakokkal rendelkező fajok, emiatt genetikailag és morfológiailag is sokkal változatosabb összetételű, mint a *Cochliobolus* 1 csoport. A 2 csoporthoz tartozik minden *Pseudocochliobolus*ok közé javasolt faj, azonban egyes fajok, pl. *Co. homomorphus* pontos helyzetét nem sikerült meghatározni egyik csoportban sem. A *Cochliobolus* nemzetség felosztása nem tekinthető eléggé megalapozottnak, mivel a vizsgált fajok mindegyike nem különül el egyértelműen a *Cochliobolus* nemzetségen belül valószínűsített csoportokba, továbbá a *Cochliobolus* 2 csoportba tartozó fajok nem mindegyike mutatja a *Pseudocochliobolus*-okra jellemző sztróma- és aszkusz-karaktereket, miközben a megfelelő anamorf alakok egyértelműen a *Pseudocochliobolus* anamorf alakoknak megfelelő jellemzőkkel rendelkeznek. Az azonban egyértelmű, hogy a *Pseudocochliobolus* és a *Co. homomorphus* fajokat eltávolítva a visszamaradó *Cochliobolus* fajok morfológiailag és szekvencia alapon is közeli rokonságban álló, monofiletikus csoportot alkotnak (Berbee és mtsi. 1999).

A Pleosporaceae család rokonsági viszonyainak 28S riboszómális DNS szekvencia-elemzésen alapuló vizsgálata során Kodsueb és munkatársai (2006) az előzőekhez hasonlóan szintén körülírták a *Cochliobolus* csoporton belül elkülöníthető két egységet, melyek közül a *Cu. pallescens*, *B. pappendorfi*, *Cu. lunata*, *Co. hawaiiensis* és *Cu. heteropogonicola* által alkotott monofiletikus csoport megfeleltethető a Berbee és munkatársai által leírt *Cochliobolus* 2 csoportnak. Azt is megállapították azonban, hogy a morfológiai hasonlóság nem minden esetben jelent monofiletikus származást. A *Cu. oryzae* és *Cu. brachyspora* fajokat egyik csoportba sem tudták besorolni, ahogy azt Berbee és munkatársai (1999) a *Co. homomorphus* esetében is tapasztalták.

A legújabb megközelítést a *Bipolaris-Curvularia-Cochliobolus* komplex rendszertani kérdéseiben Manamgoda és munkatársai (2012) képviselik az ITS, *gpd*, transzlációs elongációs faktor 1 α (*tef*) és riboszómális nagy alegység (LSU) DNS-szakaszokra alapozott tanulmányukkal. Vizsgálataikban az 1. csoportot a tipikus nagy, kenu-alakú *Bipolaris*-ok és *Cochliobolus*-ok alkotják, míg a 2. csoportba *Curvularia*-k, illetve *Bipolaris*- és *Cochliobolus*-szerű morfológiát mutató fajok csoportosultak. A korábban *Pseudocochliobolus*-ként meghatározott törzseket a 2. csoport tartalmazza. Eredményeik alapján javasolják az 1. csoportot *Bipolaris*-nak hívni, mely magába foglalja a komoly és

kevésbé komoly patogén *Bipolaris* és *Cochliobolus* fajokat. A 2. csoport elnevezéseként pedig a *Curvularia*-t javasolják, mely csoport tartalmaz minden atipikus alakkal rendelkező *Bipolaris*-t és *Cochliobolus*-t, illetve az összes *Curvularia* fajt. A *Co. homomorphus*-t az előző munkákhoz hasonlóan ők sem tudták elhelyezni egyik csoportban sem (Manamgoda és mtsi 2012).

Látható, hogy a *Cochliobolus* nemzetségen belül még mindig vannak tisztázásra váró kérdések, melyek megválaszolásához az eddig még molekuláris módszerekkel nem vizsgált 95 *Bipolaris*, 30 *Cochliobolus* és 101 *Curvularia* faj szekvencia-alapú elemzésére van szükség.

2.2. A *Cochliobolus* nemzetség tagjai a klinikumban

2.2.1. A nemzetség tagjai által okozott fertőzések

A *Bipolaris* és *Curvularia* nemzetségek egyes tagjai elsősorban légzőszervi és szaruhártya-fertőzésekből izolálhatók, ritkábban azonban a bőr és a központi idegrendszer lézióiból is azonosították őket trópusi és szubtrópusi éghajlatú területeken.

A *Bipolaris* és *Curvularia* nemzetségek jellemzőek a pigmentált gombák által okozott fertőzésekben (*phaeohyphomycosis*), melyek kialakulásában és lefolyásában nagy jelentősége van a melaninnak (McGinnis és mtsi. 1986, Revankar és mtsi. 2002, Brandt és Warnock 2003, Buzina és mtsi. 2003, Viola és Sutton 2010). A színyanyag virulencia-faktorként működik közre a fertőzésben, szerepe a környezeti stresszel szembeni védekezés, mely a humán szervezetben a védekezőrendszer által termelt reaktív oxigéngyökökkel, hidrolitikus enzimekkel és fagocitózissal szembeni hatékony ellenállást jelenti (Ikeda és mtsi. 2003).

A gombák által okozott allergiás légúti fertőzések közül nagyrészt a *Bipolaris* és *Curvularia* nemzetségek felelősek az allergiás tünetekkel járó orrmelléküreg-gyulladás (AFS), illetve az allergiás tünetekkel járó hörgő- és tüdőfertőzések (ABPM) kialakításáért (Fothergill 1996, Torres és Ro 1996, Fryen és mtsi. 1999, Buzina és mtsi. 2003, Walsh és mtsi. 2004, Viola és Sutton 2010). A két betegség klinikai megjelenése és terápiája nagyon hasonló, abban különböznek csupán, hogy az AFS esetén nem emelkedik az IgE-szint a közönséges atópiánál jellemző szint fölé, illetve nem mutatható ki a kórokozóra jellemző szérumprecipitin (Schubert 2009). Az AFS-t és ABPM-t okozhatják a fenti két nemzetség tagjain kívül még *Pseudallescheria*, illetve ritkább esetben az *Aspergillus* és *Fusarium* nemzetségekhez tartozó fajok is. Amíg csak hisztológiai vizsgálatok alapján határozták meg a kórokozókat az *Aspergillus* nemzetség tagjait tartották az AFS első számú kórokozóinak, de a

mikrobiológiai és molekuláris vizsgálatok elterjedésével tisztázódott, hogy a betegséget nagyrészt melanizált gombák okozzák (Torres és Ro 1996). A betegség túlnyomórészt a trópusi és szubtrópusi éghajlatú területeken, Indiában, Pakisztánban, Ausztráliában és az Egyesült Államok délnyugati államaiban jellemző (Buzina és mtsi. 2003). A gomba belélegzés útján kerül a szervezetbe, majd a növekvő hifaszövedék fokozatosan kitölti a szinuszokat, súlyosabb esetekben a hifaszövedék miatti nyomásnövekedés hatására a csontos részek is károsodhatnak. A terápia műtéti beavatkozás és gyógyszeres kezelés együttes alkalmazását igényli, mely rendszerint szteroidok, immunoterápia és hosszantartó itrakonazol-kezelés alkalmazásából áll (Schubert és Goetz 1998). A légúti fertőzések közül a nem-invazív gomba által kiváltott allergiás orrmelléküreg-gyulladás és a testüregeket kitöltő hifaszövedék (*fungus ball*) képzése a normál immunműködésű embereknél is előfordulhat, míg az invazív fertőzések granulomás, hiperakut és penetráló formái elsősorban legyengült védekezőrendszerű betegeknél jellemzőek (Fryen és mtsi. 1999, Silveira és Nucci 2001, Halaby és mtsi. 2001, Bilu és mtsi. 2004, Castelnovo és mtsi. 2004, Chakrabarti 2008).

A *Bipolaris* és *Curvularia* nemzetségek tagjai által kiváltott másik jelentős fertőzés a gombák által okozott szaruhártyagyulladás (keratomikózis, mikotikus keratitisz), mely szintén a trópusi, szubtrópusi éghajlatú területeken, például Indiában főként mezőgazdasági dolgozók körében elterjedt. A gombák által okozott szaruhártyagyulladás az összes keratitiszes fertőzés 40 %-át teszi ki, melynek nagyobb részét az *Aspergillus* és *Fusarium* nemzetségek tagjai okozzák, világviszonylatban azonban a fonalas gombák között a harmadik leggyakoribb kórokozók a melanizált gombák 8-17 %-os gyakorisággal (Thomas 2003, Srinivasan 2004). A fertőzésre hajlamosító tényezők között legjelentősebb a szaruhártya sérülése, majd a kontaktlencse használat, cukorbetegség és a felületi szteroid kezelések (Garg és mtsi. 2000, Srinivasan 2004). A patogenezis első lépése a kórokozó hámszöveti sérülésen keresztül történő bejutása a szaruhártya szövetébe, ahol mélyen penetrál, majd gyulladásos gócot alakít ki, melyek végül a szaruhártya fekélyesedéséhez vezetnek (Thomas 1994). A betegség a látás romlásán túl a nem megfelelő kezelés következtében vakság kialakulásához, illetve ritka esetben a szem elvesztéséhez is vezethet (Garg és mtsi. 2000, Thomas 2003, Bashir és mtsi. 2009). Diagnosztizálása szaruhártyamintából történik mikroszkópos vizsgálattal, majd hifatörmelékek jelenléte esetén tenyésztést követően morfológiai, ritkábban polimeráz láncreakción (PCR) alapuló azonosítás is következik (Revankar és mtsi. 2002, Srinivasan 2004). A terápia során, az egyébként mikózisok kezelésében leghatékonyabb poliének gyenge felszívódásuk miatt csak kevésbé súlyos, felületi fertőzések kezelésére alkalmasak, komolyabb esetben kiegészítő kezelésként azokat alkalmazzák (Thomas 2003).

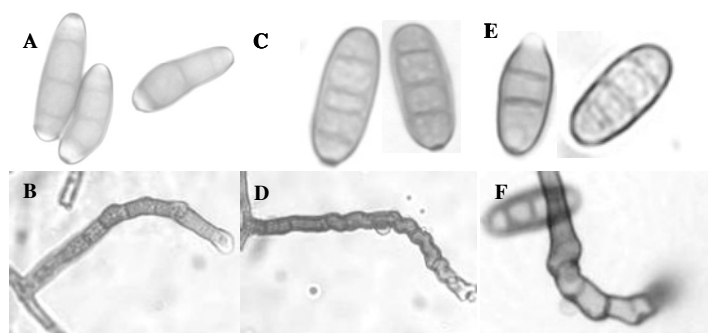
A *B. australiensis* ismert hólyagos bőrgyulladás, allergiás tünetekkel járó krónikus orrmelléküreg-gyulladás, allergiás tünetekkel járó hörgő és tüdőfertőzés, belsőszem-gyulladás és normális védekezőrendszerű ember disszeminált fertőzésének kórokozójaként is (Chalet és mtsi. 1986, Flanagan és Bryceson 1997, del Palacio és mtsi. 1997, Newell és mtsi. 2006, Dyer és mtsi. 2008). A bőr alsó rétegeit érintő fertőzéseket, invazív és allergiás tünetekkel járó orrmelléküreg-gyulladást, szaruhártyafekélyt és hashártyagyulladást is magába foglaló pigmentált gombák által okozott fertőzésekből gyakran izolálhatók *B. hawaiiensis* törzsek (Anandi és mtsi. 1988, Costa és mtsi. 1991, Gadallah és mtsi. 1995, Fryen és mtsi. 1999, Castelnovo 2004, Bashir és mtsi. 2009). A *B. spicifera* ugyancsak gyakori kiváltója az orrmelléküreg-gyulladásnak, bőr felületi fertőzéseknek, szaruhártyafekélynek, hashártyagyulladásnak, agyhártyagyulladásnak és disszeminált fertőzéseknek is (Straka és mtsi. 1989, Hemashettar és mtsi. 1992, McGinnis és mtsi. 1992, Latham 2000, Moore és mtsi. 2001, Bava és mtsi. 2003, Buzina és mtsi. 2003). A *Cu. geniculata*, *Cu. lunata* és *Cu. senegalensis* fajok képviselőit pigmentált gombák által okozott fertőzésekből, allergiás tünetekkel járó orrmelléküreg-gyulladásból, szaruhártyafekélyből és bőr léziókból azonosították (Rinaldi és mtsi. 1987, Ebright és mtsi. 1999, Fernandez és mtsi. 1999, Guarro és mtsi. 1999, Wilhelmus és Jones 2001).

2.2.2. A humán kórokozó *Cochliobolus* fajok elkülönítése

A klinikai gyakorlatban előforduló pigmentált gombák azonosítása a mai napig elsősorban morfológiai bélyegek mikroszkópos vizsgálatán alapul (Fothergill 1996, Saubolle és Sutton 1996, Saenz és mtsi. 2001, Saha és Das 2005, Eghtedari 2006, Chowdhary és mtsi. 2011). A *Cochliobolus-Bipolaris-Curvularia* nemzetségekre vonatkozóan e morfológiai bélyegeket (elsősorban a konídiumok fajspecifikus jellegzetességeit) McGinnis és munkatársai (1986) határozták meg a pigmentált gombák által okozott fertőzésekből származó *Bipolaris* és *Exserohilum* izolátumok vizsgálata alapján. Manapság is az ő tanulmányukban rögzített értékeket használják a fertőzésekből származó izolátumok fajszerű azonosítására.

E leírás alapján a *B. australiensis* egyenes, mindkét végén lekerekített, ellipszoid alakú, vékony válaszfalakkal tagolt konídiumot képez, míg a csonka hílumot egy apró áttetsző zóna határolja. A konídiumok tipikusan három válaszfalúak, legfeljebb 10 %-uk tartalmaz négy vagy öt válaszfalat és átlagosan 8,3 µm szélesek és 23,2 µm hosszúak (McGinnis és mtsi. 1986, **1. A ábra**). Képződésük egy magányosan álló, sima falú, cikk-cakk alakban végződő konídiumtartón zajlik (Tsuda és Ueyama 1981, **1. B ábra**). A *B. spicifera* fajok által képzett konídiumok egyenesek, mindkét végükön lekerekített, henger alakúak. A sötét

hílumot egy áttetsző zóna határolja, a konídiumok három válaszfalat képeznek, de ritkán két és négy vékonyszeptumú konídiumok is előfordulnak. A konídiumok átlagos szélessége 9,6 μm , míg hossza 26,5 μm (McGinnis és mtsi. 1986, **1. C ábra**), nem elágazó, szeptált, cikk-cakk alakú konidiofórról képződnek (Nelson 1964, **1. D ábra**). A *B. hawaiiensis* faj konídiumai ugyancsak egyenes, mindkét vége felé lekerekített, ellipszoid alakúak, sötét hílumot és vékony válaszfalakat tartalmazó képletek. Tipikusan négy vagy öt válaszfalat képeznek, de előfordulnak három és hat válaszfalú konídiumok is, átlagos szélességük 6,8 μm , míg hosszúságuk 23,3 μm (McGinnis és mtsi. 1986, **1. E ábra**). A konidiofórjuk nem elágazó és szeptált (Luttrell 1964, **1. F ábra**).



1. ábra: Az opportunistá humánpatogén fajok elkülönítésében szerepet játszó legfontosabb karakterek: a konídiumok válaszfalainak száma, alakja és mérete. A *B. australiensis* CBS 172.57 típusörzs konídiumai (**A**) és konídiumtartója (**B**), a *B. spicifera* CBS 274.52 típusörzs konídiumai (**C**) és konídiumtartója (**D**), illetve a *B. hawaiiensis* CBS 173.57 konídiumai (**E**) és konídiumtartója (**F**).

A *Curvularia* nemzetséghez tartozó fajok általános jellemzője, hogy a konídium központi sejtje jelentősen megvastagodott, ami miatt a körtealakú konídium hajlott formát vesz fel (Wilhelmus és Jones 2001). Emellett gyakran a középen elhelyezkedő válaszfal sokkal sötétebb, mint a kívül elhelyezkedők. A hílum sötét színű, kiemelkedő. A *Curvularia* fajokat a válaszfalak száma, a konídium színe és alakja, illetve a középen elhelyezkedő válaszfal színe alapján lehet megkülönböztetni egymástól. A konídiumok egyedül álló vagy elágazó konidiofórról képződnek, mely a konídiumok képződési helyénél meghajlik. Ezek alapján a szaruhártyafekélyből viszonylag gyakran izolálható *Cu. senegaliensis* általánosan négy válaszfalat képez, a fuziform vagy ellipszoid konídiumok sötétbarnák, a sejtek világosak. A konídium enyhén hajlott, hossza 22-31 μm , szélessége a legszélesebb szakaszon 11-14 μm (Subramanian 1956). A szaruhártyagyulladásban jellemzően előforduló másik *Curvularia* faj a *Cu. geniculata*. Konídiuma átlagosan négy válaszfalat tartalmaz, de az

előzővel ellentétben a megvastagodott, sötétbarna központi sejtéből indul a csíratömlő képzés. A konídium hajlott, enyhén fuziform, a csúcsi sejtek nagyon világosak vagy átlátszóak (Nelson 1964, Guarro és mtsi. 1999). A klinikai mintákban előforduló *Cu. brachyspora*, *Cu. clavata*, *Cu. lunata*, *Cu. pallescens* és *Cu. verruculosa* konídiumai három szeptumosak, a fajok a konídium színe, alakja és a középső válaszfal alapján különíthetők el.

Ritkán a morfológiai azonosítás megerősítéseként szekvencia alapú meghatározást is végeznek. Ennek során a legelterjedtebb mind a *Bipolaris*, mind a *Curvularia* fajok körében a magi riboszómális RNS-t kódoló szakasz ITS-régiójának felszaporítása PCR segítségével, majd a keresett szekvenciához legközelebb álló faj hasonlóság alapú keresése különböző adatbázisokból (Buzina és mtsi. 2003, Ferrer és mtsi. 2003). Emellett kísérleteznek az ITS-régió restrikciós enzimekkel történő emésztése során létrejövő, eltérő hosszúságú szakaszok alkotta fajspecifikus mintázatok (RFLP) (Fryen és mtsi. 1999, Goh 1998), illetve az ITS egyszál konformáció polimorfizmus (SSCP) vizsgálatokkal is (Kumar és Shukla 2005). Emellett a *Brn1* génre (Shin és mtsi. 2003) tervezett specifikus indítószekvenciákkal is tettek kísérletet a fajazonosításra. A felsorolt molekuláris módszerek elsősorban nemzetség szintű elkülönítésre alkalmasak (Shin és mtsi. 2003). A fajok egyértelmű azonosítása azonban nagyon fontos a megfelelő terápia kiválasztásához, amelynek késői vagy nem megfelelő alkalmazása a szem maradandó károsodásához vezethet (Shukla és mtsi. 2008).

2.2.3. A *Bipolaris* és *Curvularia* nemzetségek tagjainak antifungális szerekekkel szembeni érzékenysége

A pigmentált gombák által okozott fertőzések kezelésében elsősorban poliéneket és azolokat alkalmaznak. Az amfotericin B (AMB) topikálisan és orálisan, a natamicin (NAT) topikálisan alkalmazott polién makrolid vegyület. Hatásukat a gomba sejtmembránján fejtik ki, ahol az ergoszterolhoz kötve roncsolják a membrán ozmotikus integritását, ezáltal pórust nyitva a külső környezet felé. Az AMB máig a legszélesebb körben alkalmazott, leghatásosabb antifungális szer aszpergillózis, blasztomikózis, féohifomikózis, hialohifomikózis, kandidózis, kriptokokkózis, kokcidioidomikózis, és zigomikózis kezelésében (Ellis 2002) az elektrolitháztartás egyensúlyát felborító, anémiás és vesetoxikus mellékhatásai ellenére is (Sun és mtsi. 2002, Laniado-Laborín és Cabrales-Vargas 2009). A mellékhatások csökkentése érdekében fejlesztették ki a liposzómás és lipid komplex AMB formulákat, melyek sokkal kevésbé toxikusak a humán szervezetre. Emellett sok esetben azolok helyettesítésével próbálják kiváltani az AMB-t a terápiában. Az opportunistá patogén *Cochliobolus*-ok leggyakrabban Indiában fordulnak elő, ahol az AMB mellett a másik

leggyakrabban alkalmazott gyógyszer a NAT (Pradhan és mtsi. 2011). A NAT az egyik legkorábban kifejlesztett polién alapú gyógyszer, melyet a szem gombás fertőzésének felületi kezelésében az amerikai Food and Drug Administration is jóváhagyott (Thomas 2003, Lalitha és mtsi. 2008). Szükséges esetben ekonazollal (ECO) helyettesíthető (Thomas 2003).

Az AMB mellett az azolok alkalmazása elterjedt a szisztémás fertőzések terápiájában, melyek közül az imidazolokat, mint az ekonazolt (ECO), ketokonazolt (KET), klotrimazolt (CLZ) és mikonazolt (MCZ) felületi kezeléseknél, a triazolok közé tartozó flukonazolt (FLU), itrakonazolt (ITR) és vorikonazolt (VCZ) pedig intravénásan és orálisan alkalmazzák (Nyilasi és mtsi. 2010). Hatásuk a citokróm P450 függő C14- α demetiláz enzim gátlásán alapul, melynek következtében C14-metilált szterolok (lanoszterol; 4,14-dimetilzimoszterol; 24-metiléndihidrolanoszterol) halmozódnak fel a sejtmembránban ergoszterol helyett, ezáltal más szerkezetű membránt kialakítva. Emellett egyes azolok, (MCZ, KET, ECO) számos membránkötött enzim aktivitására is negatív hatással vannak (Lorenz és Parks 1990, Andriole 1999, Ghannoum és Rice 1999). Hatásukat az emlősök sejtmembránján sokkal magasabb koncentrációban fejtik ki, mint a gombák esetében (Hitchcock és mtsi. 1990). Biztonságosabban alkalmazhatók, mint a poliének, de a citokróm P450-et érintő metabolizmusuk miatt más gyógyszerekkel történő együttes alkalmazásuk fokozott figyelmet igényel. Az imidazolok még jelentősebben, a triazolok azonban már kevésbé toxikusak a májra (Benkő és mtsi. 1999). A pigmentált gombák kezelésében az azolok közül szisztémásan az ITR, míg topikálisan az ECO bizonyult a leghatékonyabbnak (Thomas 2003). Az ITR hatásos a szisztémás blasztomikózis és hisztoplazmózis kezelésében is, illetve ezzel a hatóanyaggal helyettesítették elsőként az AMB-t invazív aszpergillózissal szemben (Denning és mtsi. 1997). Alacsony toxicitása miatt napjainban is a hosszantartó antifungális terápiák legfontosabb gyógyszere. A szem esetében a felületi kezelések hatékonyságát a rossz szöveti penetráció nehezíti (Pradhan és mtsi. 2011), így a nagydózisú felületi terápiát további gyógyszeres kezeléssel kell kiegészíteni.

Az antifungális terápiában elsősorban a dermatofiták ellen alkalmazzák sikerrel a terbinafint (TRB). Ergoszterol-bioszintézist gátló hatását a szkvalén-monooxigenázon keresztül fejt ki, emiatt ergoszterol helyett szkvalén halmozódik fel a membránban és roncolja annak integritását (Ghannoum és Rice 1999). Az irodalomban nem áll rendelkezésre adat a TRB *Cochliobolus* izolátumokat gátló hatására vonatkozóan. Más pigmentált gombák körében azonban többségében magas, 4 $\mu\text{g/ml}$ körüli minimális gátló koncentráció (MIC) értékeket határoztak meg, de volt olyan *Alternaria* izolátum is, melynél kifejezetten alacsony (0,25 $\mu\text{g/ml}$) MIC értéket mértek (Garcia-Effron és mtsi. 2004).

A *Bipolaris* és *Curvularia* fajok antimikrobiális érzékenységére vonatkozóan többségében szélesebb körben végzett tanulmányokban található adatok, melyekbe a pigmentált gombák képviselőiként, nemzeti szinten fajazonosítás nélkül *Bipolaris* sp.-ként vonták be őket (Espinel-Ingroff 1998, Espinel-Ingroff és mtsi. 2002, Ellis 2002, Pfaller és mtsi. 2002, Sabatelli és mtsi. 2006). A ritkábban előforduló melanizált gombák körében csak kevés tanulmány foglalkozik fajszintű érzékenységi tesztekkel. Ezek közül Espinel-Ingroff és munkatársai (2001, 2002), illetve McGinnis és mtsai. (1998a, 1998b) az AMB, FLU, ITR és VOR hatását vizsgálták *Bipolaris* és *Curvularia* fajokkal szemben, míg Guarro és mtsai. (1999) az AMB, FLU, ITR, KET és MCZ MIC-értékeit határozták meg a *Curvularia* nemzetség egyes tagjaira. A mindkét tanulmányban szereplő antifungális szerek (AMB, ITR, VCZ) gátlási értékeit összevetve nagyon eltérő értékek jöttek ki eredményül. A legkiugróbb különbséget a VCZ esetében találtuk, melyre Espinel-Ingroff (2002) 0,06-1 µg/ml értéktartományon belül határozta meg az izolátumok fajonként összesített MIC értékét, ezzel szemben Guarro és munkatársai (1999) ugyanolyan kísérleti körülmények között 16-128 µg/ml értéktartományon belüli MIC értékeket adtak meg ugyanazon fajok izolátumait vizsgálva. Emellett a klinikai mintákból leggyakrabban izolálható *B. spicifera* ITR-rel szembeni MIC értékét egyes vizsgálatok 0,03-1 µg/ml (McGinnis és Pasarell 1998a), mások 0,03->8 µg/ml (Espinel-Ingroff 2001) és 0,5->8 µg/ml (Espinel-Ingroff és mtsi. 2002) értékek között határozták meg azonos kísérleti körülmények mellett. Az eddigiek alapján is látható, hogy izolátumtól függően tág tartományban változnak az antifungális szerek *Cochliobolus* fajokkal szemben meghatározott gátló koncentrációi, ezért az antimikrobiális érzékenységi tesztek eredményeit célszerűbb faj, még inkább izolátum szintjén megadni. A manapság használt antifungális vegyületek sok esetben a humán szérumban elérhető maximális koncentrációval megegyező vagy annál magasabb koncentrációban alkalmazva képesek csak gátolni a *Cochliobolus* izolátumok növekedését. Alkalmazhatóságukat tovább korlátozza a vegyületekkel szemben gyorsan kialakuló rezisztencia. Ezen okok miatt napjaink fontos kutatási területe az újabb, hatékonyabb vegyületek keresése, illetve a klinikai gyakorlatban más hatásaik miatt már ismert és biztonságosan alkalmazott vegyületek antifungális hatásának feltérképezése. Ilyen nem gombaellenes szerként használt, de gombaellenes hatással is rendelkező vegyületek a sztatinok. A sztatinokat az 1980-as évek végétől használják a gyógyászatban koleszterinszint-csökkentő gyógyszerként. Antifungális hatásukat először a nem patogén *Saccharomyces cerevisiae*-vel szemben írták le (Lorenz és Parks 1990), majd azt később *Candida* és *Cryptococcus neoformans* fajokon (Chin és mtsi. 1997), illetve *Aspergillus fumigatus*-on (Macreadie és mtsi. 2006, Qiao és mtsi. 2007) és a járomspórás

gombákhoz tartozó opportunistá patogéneken (Chamilos és mtsi. 2006, Galgóczy és mtsi. 2009, Nyilasi és mtsi. 2010) is bizonyították. Hatásukat a 3-hidroxi-3-metilglutaril-koenzim A (HMG-KoA) reduktáz gátlásán keresztül fejtik ki, akadályozva a HMG-KoA mevalonáttá alakítását, mely az ergoszterol bioszintézis egyik kulcsfontosságú lépése (Stancu és Sima 2001). Általánosságban igaz, hogy a szintetikus sztatin vegyületekhez tartozó atorvasztatin (ATO), fluvasztatin (FLV) és rozuvasztatin (ROS) erősebb antifungális hatással rendelkezik, mint a természetes származékokat alkotó lovasztatin (LOV), szimvasztatin (SIM) és pravasztatin (PRA) (Barrios-Gonzales és Miranda 2010). Élesztőkkel szemben a szimvasztatin (SIM), míg fonalas gombákkal szemben a fluvasztatin (FLV) hatékonyabbnak (Nyilasi és mtsi. 2010). Önmagában azonban egyik vegyület sem alkalmazható a gombás fertőzések kezelésére, mivel minden hatóanyag a szérumban maximálisan elérhető szintet jelentősen meghaladó koncentrációban képes csak gátolni a tesztelt járomspórás és aszkuszos gombákat (Galgóczy és mtsi. 2009). A *Bipolaris* nemzetség tagjainak sztatin érzékenységét mindezidáig nem vizsgálták.

A hatékonyabb gombaellenes kezelések kidolgozásának másik iránya a hatóanyag kombinációs terápiák kutatása. Több hatóanyag együttes alkalmazása egyrészt csökkenti a rezisztencia kialakulásának lehetőségét, illetve az alkalmazott alacsonyabb dózisok miatt a szevezetre kifejtett toxikus hatást, másrészt növeli a kezelés hatékonyságát azáltal, hogy a kombinációs terápiák szélesebb kórokozóspektrumra is kiterjeszthetők (Nosanchuk 2006). Járomspórás, *Candida* és *Aspergillus* törzseken végzett *in vitro* kísérletekben AMB-t kombinálva FLV-vel, illetve ROS-nal a szérumban elérhető szintre lehetett csökkenteni a sztatinok gátláshoz szükséges koncentrációját, ami együttjárt az AMB minimális gátló koncentrációjának csökkenésével is (Nyilasi és mtsi. 2010). Emellett az azok és sztatinok kombinációjának járomspórás gomba izolátumokkal szembeni vizsgálata során szinergizmust állapítottak meg a VCZ és LOV hatóanyagok között (Chamilos és mtsi 2006), és szintén szinergista kölcsönhatást figyeltek meg FLU-t ATO, LOV és SIM vegyületekkel kombinálva a FLU-ra önmagában inszenzitív *Aspergillus flavus* esetében, ahol a kombinációk teljesen gátolták a gomba növekedését (Nyilasi és mtsi. 2010). Emellett a sztatinok antifungális peptidekkel is képesek pozitív kölcsönhatásba lépni és gátolni egyes *Zygomycetes* törzsek növekedését (Galgóczy és mtsi. 2009). Az *in vitro* tesztek tanúsága szerint a humán gyógyászatban évtizedek óta alkalmazott koleszterinszint-csökkentő sztatinok és antifungális szerek kombinációi jelentősen csökkentik a számos mellékhatással rendelkező hagyományos antifungális hatóanyagok koncentrációit. A kombinációk alkalmazásánál azonban nagyon körültekintőnek kell lenni, hiszen a sztatinok és a legtöbb azol antifungális szer

metabolizációja a máj citokróm P450 enzimrendszerén (CYP) keresztül zajlik, így az ilyen vegyületek együttes alkalmazása súlyos mellékhatásokat, mint például a rabdomiópátia, válthat ki (Mazzu és mtsi. 2000). Ezért kerülendő például a VCZ és a LOV együttes alkalmazása, ugyanis mindkét hatóanyag a CYP3A4 enzimén keresztül metabolizálódik (Galgóczy és mtsi. 2009). Ugyanakkor találhatók olyan vegyületek is, melyek különböző CYP izoenzimeken metabolizálódnak, például az AMB a CYP3A1-en, a FLV a CYP2C9-en, a ROS pedig a CYP2C9 és CYP2C19-en (Bellosta és mtsi. 2004, Schachter 2004), így ezek együtt is mellékhatások nélkül alkalmazhatók.

A *Cochliobolus* nemzetségre vonatkozó hatóanyag-kombinációs tesztekéről nincsenek irodalmi adatok.

2.2.4. Az extracelluláris enzimek termelésének szerepe a humán kórokozó gombák patogenitásában

Az opportunistá patogén gombák által okozott fertőzésekben, amikor a kórokozó sérülésen keresztül jut a szervezetbe, a bejutást követően a szöveti penetrációban fontos szerepet játszanak, sőt több esetben bizonyítottan virulencia-faktorként működnek a különböző extracelluláris enzimek. A gomba által termelt enzimeknek a szövetek invázióján túl a gazdaszervezet védekezőrendszere által termelt fehérjetermészetű anyagok eliminációjában, a megváltozott környezethez való alkalmazkodásban, illetve a táplálékfelvételben van szerepe (de Souza és mtsi. 2008). A pigmentált gombák által okozott féoifomikózisok tünetegyüttesét tekintve legjelentősebb virulencia-faktorként a melanin termelését tartják számon (Revankar és mtsi. 2002), ám fontos szerepe lehet még a keratináz, elasztáz, foszfolipáz és proteináz enzimek termelésének is. A pigmentált humán kórokozó gombák extracelluláris enzim termeléséről nagyon kevés adat áll rendelkezésünkre, különösen a *Cochliobolus* nemzetségre vonatkozóan. A legtöbb *Cochliobolus* nemzetséggel végzett tanulmány a növénypatogén fajok közé tartozó *B. sorokiniana* és *B. oryzae* izolátumok enzim termelésére vonatkozik (β -glükózidáz, β -N-acetilglükózaminidáz, β -xilozidáz, cellobiohidroláz, kitobiohidroláz, pektin-liáz, karboximetil-celluláz). Ezen izolátumok esetén bizonyított, hogy az enzimtermelés fontos virulencia faktor a növényi szövetek inváziójában (Geimba és Brandelli 2002, Poloni és mtsi. 2009).

A proteáz-, elasztáz- és lipáztermelés képességét számos humán patogén gombafaj esetén összefüggésbe hozták a virulencia mértékével. *A. fumigatus*, *A. flavus* és *A. niger* izolátumok proteáz és elasztáz aktivitásának vizsgálata során megfigyelték, hogy a klinikai mintákból származó izolátumok jobb enzimtermelők a nem patogén izolátumoknál (Kothary

és mtsi. 1984, Hogan és mtsi. 1996, Alp és Arikan 2008). Számos *Candida* faj esetén ismert, hogy a termelt aszpartil proteázok a fertőzések során fontos virulencia-faktorként működnek közre (Schaller és mtsi. 2005), több faj esetén pedig a foszfolipáz és lipáz termelés virulenciában betöltött szerepét vizsgálták (Gácsér és mtsi 2007). A proteáztermelés a humán szövetek kolonizációjában, illetve a gazdaszervezet védekezőrendszere által termelt fehérjetermészetű anyagok bontásában jelentős. A foszfolipáz és lipáz produkció a sejtmembránok roncsolásában és a gomba penetráció elősegítésében játszik szerepet (Alp és Arikan 2008). Az elasztáz elsősorban a pulmonáris fertőzéseket okozó gombák patogenezisében fontos, ugyanis ez által tudják a tüdő szöveti szerkezetének 30 %-át kitevő elasztint hatékonyan degradálni (Rhodes 1995, Alp és Arikan 2008). A dermatofita gombák által termelt keratináz enzim a bőr és más keratinból felépülő részek (haj, köröm, toll) inváziójában játszik szerepet. A legismertebb keratinolitikus aktivitással rendelkező gombák a bőrgombák közül a *Trichophyton*, *Microsporum*, *Chrysosporium* nemzetségekhez tartoznak, de más gombák, mint például a *Candida* és a *Malassezia* fajok is rendelkeznek ilyen enzimekkel. A *Cochliobolus* nemzetség tagjai közül a *Curvularia* izolátumok keratináz termelését bizonyították tollhulladékok bontását célzó átfogó vizsgálatokban (Jain és Agrawal 1980, Friedrich és mtsi. 1999, Kaul és Sumbali 2000). Emellett, a klinikai esetleírások szerint, a *Curvularia* fajok gyakrabban fordulnak elő humán és állati kután léziókban (Tessari és mtsi. 2003, Gughani és mtsi. 2008, Knapp és mtsi. 2008), mint a *Bipolaris* fajok (Costa és mtsi 1991, Straka és mtsi. 1989), feltételezhetően azért, mert jobb keratináztermelők. Nem dermatofita keratináztermelő fajokat azonosítottak már az *Aspergillus*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium* és *Penicillium* nemzetségekből (Ali és mtsi. 2011), melyek hasznosak lehetnek a természetben nehezen bomló, keratintartalmú állati hulladékok biológiai bontásában is (Friedrich és mtsi. 1999).

2.3. A *Cochliobolus* nemzetség növénypatogén tagjainak és a termelt másodlagos-metabolitok általános jellemzése

2.3.1. A növénykórokozó *Cochliobolus* fajok célpontjai

A *Cochliobolus* nemzetség tagjai főként talajból és növényi részekről izolálhatók. A nemzetséget a XX. század második felében Észak-Amerikában okozott súlyos helminthospóriumos kukoricafertőzés óta tartják számon jelentős fitopatogéneket magába foglaló csoportként. Mára a nemzetség tagjai világszerte elterjedtek a trópusi és szubtrópusi

éghajlatú területeken (**2. ábra**), de minden magas páratartalmú és 20-30 °C közötti átlaghőmérsékletű régióban megjelenhetnek (Berbee és mtsi. 1999).



2. ábra: A *B. maydis* okozta kukorica levélfoltosság földrajzi elterjedése napjainkban. A gomba által okozott fertőzés terjedésének a 20-32 °C közötti hőmérséklet és a párák időjárás kedvez (CAB Int. 2003).

Elsősorban gazdasági haszonnövények, azon belül is gabonafélék körében okoznak fertőzéseket, melyek közül máig a legismertebb és legpusztítóbb járvány az Egyesült Államok déli államait érintő *B. maydis* (*Co. heterostrophus*) okozta kukorica levélfoltosság volt. A fajt egészen az 1970-es évekig nem sorolták a jelentős kukorica patogének közé, addig amíg nem okozott egy 15-20 %-os termés kieséssel járó járványt. Ezt követően komoly kutatások indultak meg a *Bipolaris*ok növénykórokozó képességére vonatkozóan, melyek feltárták, hogy a fertőzés hatékonysága a termelt toxinoknak köszönhető. A fertőzések tünetei kezdetben kisebb méretű (1-2 mm²), elszórt, sötét színű nekrotikus zónák formájában jelennek meg, majd a fertőzés előrehaladtával a nekrotikus zónák száma és mérete is növekszik. Ezek a megjelenő klorózisos foltokkal együtt idővel a levél fotoszintetizáló felületének jelentős részét tönkreteszik, ami miatt csökken a magkitöltés és a termés hozam (Levings és mtsi. 1995, Bálint-Kürti és mtsi. 2006). A *Cochliobolus* nemzetséghez tartozó legjelentősebb növénykórokozók: a *B. oryzae* (teleomorf *Co. miyabeanus*), melynek fő gazdanövénye a rizs; a cukornádát támadó *B. sacchari*; a búzán és árpan jellemző *B. zeicola* (*Co. carbonum*), *B. victoriae* (*Co. victoriae*) és *B. sorokiniana* (*Co. sativus*) (Alcorn 1983a, Manamgoda és mtsi. 2011).

2.3.2. A *Cochliobolus* fajok által termelt fontosabb másodlagos metabolitok és hatásaik

A nemzetség tagjai által termelt másodlagos metabolitok szerkezetüket tekintve lehetnek peptidok (ciklikus és aciklikus), poliketidek és terpén származékok. A növények fertőzésében szerepet játszó vegyületek nagyrészt kis molekulású toxinok, melyek

lehetnek gazda-specifikusak vagy nem gazda-specifikusak. A gazda-specifikus toxinok egy adott fajtájú növényrel, vagy jól körülhatárolt csoportjukkal szemben hatásosak, mivel a toxinra érzékeny növény genetikai állományában jelen van egy, a hatóanyag számára specifikus molekuláris célpont. A vegyületek másik csoportját a nem specifikus toxinok alkotják, melyeknek nincs behatárolt gazdaspektruma és hatásukat koncentrációfüggő módon fejtik ki (Walton 1996, Berestetskiy 2008). Egy másik használatban lévő csoportosítás a patogénitás szempontjából osztja fel a vegyületeket. A patotoxinok nagyon alacsony koncentrációban is hatásosak, jelenlétük szükséges a sikeres fertőzéshez, emiatt az adott faj nem-termelő mutánsai nem is virulensek. Ilyen típusú toxinok termelése jellemző az *Alternaria* és *Cochliobolus* nemzetségek egyes tagjaira. A másik csoportot a vivotoxinok alkotják, melyeket a termelő szervezet kimondottan a fertőzött növényi szövetben szintetizál, ahol a termelt toxin mennyisége elérve a megfelelő koncentrációt kiváltja a betegség jellemző tüneteit. A vivotoxinok nem mutatnak gazdanövény specifitást, továbbá a toxint nem-termelő mutánsok is virulensek (Berestetskiy 2008).

Az eddig felfedezett 20 gazda-szelektív toxin (*host selective toxin*, HST) többségét a *Helminthosporium* komplexhez tartozó fajok termelik (Walton 1996, 2006). Közülük legismertebbek a *B. maydis* termelte poliketid típusú T-toxin, a *B. victoriae* által termelt ciklikus peptid természetű viktorin, a *Co. carbonum* 1-es fajtájából izolált HC-toxin és a *B. sacchari* által szekretált helmintosporozid vagy HS-toxin (Shotwell és Ellis 1976, Manamgoda és mtsi. 2011).

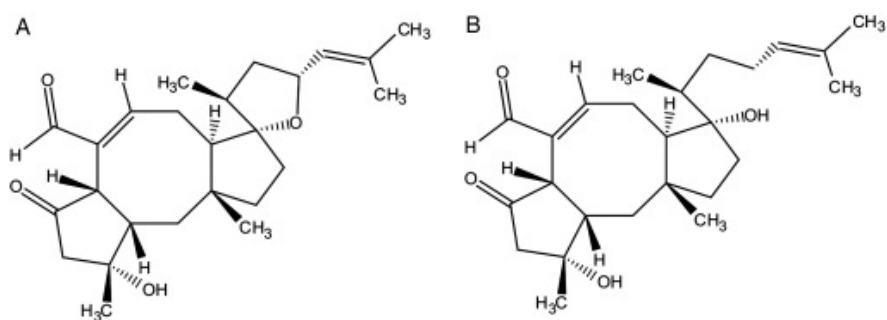
A nem gazda-szelektív toxinok között a legnagyobb családot a ciklikus terpenoidok alkotják, melyek képződése *Cochliobolus*okban a mevalonát úton keresztül zajlik. Ennek során az acil- és acetoacetyl-koenzim A-ból a 3-hidroxi-3-metilglutaril-koenzim A szintáz (HMG-KoA szintáz) segítségével 3-hidroxi-3-metilglutaril-koenzim A (HMG-KoA) jön létre. A HMG-KoA-ból a HMG-KoA reduktáz létrehozza a mevalonátot, mely három foszforilációs és egy dekarboxilációs reakció során végül izopentenil-5-pirofoszfáttá (IPP) alakul. A terpénszintézis következő szakaszában az öt szénatomos (C₅) IPP, és az IPP izomerizációjával létrejött dimetil-allil pirofoszfát (DMAP) preniltranszferázok által katalizált fej-farok illeszkedésű kondenzációja játszódik le több lépésben, így eltérő hosszúságú, de mindig az öt többszörösének megfelelő szénláncú vegyületek jönnek létre. A legfontosabbak a tíz szénatomos geranil-pirofoszfát (GPP), a tizenöt szénatomos farnezil-pirofoszfát (FPP) és a húsz szénatomos geranilgeranil-pirofoszfát (GGPP), melyek további élettani és ipari szempontból is jelentős végtermékek leágazási pontjai. A továbbiakban ezekből az aciklikus köztitermékekből különböző specifikus szintézis utakon jönnek létre a gyakran ciklikus

monoterpének (GPP prekursor), szeszkviterpének (FPP prekursor) és diterpének (GGPP prekursor) (Davis és Croteau 2000).

A gomba terpenoidok legnépesebb csoportját a szeszkviterpének alkotják, de mellettük sok fitotoxikus hatású diterpént (C_{20}) és szeszterterpént (C_{25}) is azonosítottak a *Bipolaris* és rokon nemzetségekből. A helmintosporol egy monoaldehid szeszkviterpén, melyet *B. sorokiniana*-ból (*Co. sativus*) izoláltak. A toxin jelen van már a konídiumban is, de a csírázás folyamán szabadul fel és a hifa növekedése során is folyamatosan termelődik (Apoga és mtsi. 2002). A vegyület dialdehid analógjával, a helmintosporallal együtt felelős a búzán, árpán, zabon és rizsen jelentkező gyökérrothadásos és levélfoltosodásos tünetekért (Sivanesan 1987, Apoga és mtsi. 2002). A látható tünetek hátterében a mitokondriális oxidatív foszforiláció és a membrán protonpumpáinak gátlása áll, ami a protonok és a szubsztrát anionok kiáramlását eredményezi (Briquet és mtsi. 1998). Azonban a *B. sorokiniana* virulenciájáért elsősorban a helmintosporol előanyaga, a prehelmintosporol felelős (Apoga és mtsi. 2002). Hatása kis koncentrációban a H^+ -ATPáz, ATP-hidrolízis és Ca^{2+} felvétel, nagy koncentrációban a β -1,3-glükán-szintáz gátlásában mutatkozik meg (Olbe és mtsi. 1995, Kumar és mtsi. 2002). Prehelmintosporol termelését leírták más *Bipolaris*-ok, például *B. setariae*, *B. zeicola* és *B. victoriae*-ben is. A *B. sorokiniana* fermentlevéből elválasztott további szeszkviterpén típusú toxin a sorokinianin, mely az árpa magok csírázását gátolja (Nakajima és mtsi. 1998).

A *Cochliobolus*-ok által termelt terpén típusú vegyületek egyik jellegzetes csoportját a huszonöt szénatomos (C_{25}) szeszterterpének alkotják. Ez egy viszonylag ritka vegyületsorozat, melynek képviselőit főleg tengeri mikroorganizmusokból, illetve egyes *Aspergillus*, *Cochliobolus* és *Drechslera* fajokból izolálták, de hasonló anyagokat leírtak már növényekben és rovarokban is (Cutler és mtsi. 1984, Au és mtsi. 2000, Wei és mtsi. 2004). A legjelentősebb, *Bipolaris*-ok által termelt szeszterterpén típusú vegyületek az ophiobolinok. A rizs levélfoltosságát okozó *B. oryzae* által termelt toxint két független kutatócsoport is egyidőben írta le (Orsenigo 1957, Nakamura és Ishibashi 1958), majd ezt több analóg vegyület felfedezése követte különböző *Bipolaris* fajokból. Emiatt sokáig úgy vélték, hogy a szokatlan szerkezetű vegyület termelése csak ehhez a nemzetséghez köthető. Az ophiobolin A-t és B-t *B. oryzae*-ből (Canonica és mtsi. 1966), az ophiobolin C-t *B. ziziane*-ből (Nozoe és mtsi. 1966), míg az ophiobolin F-t *B. maydis*-ből (Nozoe és mtsi. 1968) izolálták először. Az elkövetkező években más nemzetségekben is azonosítottak ophiobolin származékokat, *Aspergillus ustus*-ban ophiobolin G, H, K és epiophiobolin K-t (Cutler és mtsi. 1984, Singh és mtsi. 1991), míg *Cephalosporium caeruleum* és *Emericella versicolor* törzsekből további ophiobolin vegyületeket azonosítottak (Itai és mtsi. 1967, Cutler és mtsi. 1984, Wei és mtsi.

2004). Ma már több mint huszonötféle, változatos biológiai aktivitással rendelkező ophiobolin analógot ismerünk, jelölésük a felfedezés sorrendjében történik A-tól O-ig (Au és mtsi. 2000, Michalak és mtsi. 2005). A 3. ábrán a legjobban jellemzett ophiobolin A és az ophiobolin B szerkezete látható. Az ophiobolinok bioszintézisének részletei még nem teljesen feltártak. A molekula izoprén alapvázát alkotó diciklopenta-ciklooktaén (5-8-5) gyűrűrendszer kialakulásában az utolsó ismert lépés a geranilfarnezil-pirofoszfát (GFPP) ciklizációja. A további lépésekből csupán néhány feltételezett köztermék és enzim ismert (Dewick 2002).



3. ábra: Az ophiobolin A és B szerkezeti ábrája. A szeszerterpén típusú vegyületek jellemzője az 5-8-5 triciklikus váz. Változatos biológiai aktivitásukat az alapvázhoz kapcsolódó oldalláncoknak és funkciós csoportoknak köszönhetik.

A vegyületcsoport tagjai közül az ophiobolin A-t jellemezték eddig legjobban. Növényeket károsító hatását a gyökér és a koleoptil növekedésének gátlásán (Orsenigo 1957), a sejtmembrán átjárhatóságának megváltoztatásán (Chattopadhyay és Samaddar 1976, Cocucci és mtsi. 1983), a β -1,3-glükán-szintáz gátlásán (Fukushima és mtsi. 1993) és kalmodulin kötő aktivitásán keresztül fejt ki (Leung és mtsi. 1984). Emellett leírták antimikrobiális (Li és mtsi. 1995, Krizsán és mtsi. 2010), rákos sejtvonalakkal szembeni citotoxikus (Shen és mtsi. 1999) és L1210 sejteken apoptotikus (Fujiwara és mtsi. 2000) hatását is. A vegyület biológiai aktivitását a 3. szénatomon lévő hidroxil csoportnak, a 6. szénatom sztereokémiai elrendeződésének és a 7. szénatomon lévő aldehid csoportoknak köszönheti (Au és mtsi. 2000). A kalmodulin kompetitív gátlását a molekula a fehérje 75. és 148. pozíciójában lévő lizinjének kötésével éri el, továbbá elfedi a 77. pozícióban lévő lizin kötőhelyet, így megakadályozva más molekulák hozzáférését a kalmodulinhoz (Au és Leung 1998, Au és mtsi. 2000). Kalmodulin gátló hatása miatt az ophiobolin A-t jelenleg enzimaktivitás vizsgálatokban használják. Az ophiobolin A mellett az ophiobolin B, I és az ophiobolin A lakton formájának antifungális hatását is leírták (Li és mtsi. 1995, Au és mtsi.

2000). Az ophiobolin C HIV integráz gátlása (Singh és mtsi. 2003) mellett, az ophiobolin K és M vegyületekhez hasonlóan, erős nematocid hatású, a gerinctelenek glutamát-függő klorid csatornáit szabályzó ivermektin nem kompetitív gátlásán keresztül fejt ki hatását (Singh és mtsi. 1991, Tsipouras és mtsi. 1996). Az ophiobolin A mellett citotoxikus hatású az ophiobolin O is, mely gátolja az MCF-7 rákos sejtvonal proliferációját (Yang és mtsi. 2012). A sokféle, gyógyászati szempontból is értékes biológiai hatás miatt továbbra is intenzív kutatások folynak az ophiobolinok különböző biológiai aktivitásának megismerésére, illetve bioszintézisére vonatkozóan.

3. CÉLKITŰZÉSEK

1. Munkánk során célul tűztük ki a nehezen elkülöníthető humán kórokozó *Bipolaris* fajok azonosításában manapság használt morfológiai és molekuláris karakterek felülvizsgálatát. Ehhez keratomikózisokból izolált *Cochliobolus* nemzetséghez tartozó törzsek konídiumainak alaktani vizsgálatát és a magi riboszómális RNS-kódoló régió ITS szakaszának szekvencia elemzését terveztük elvégezni.
2. Célul tűztük ki a fajazonosításban használható új molekuláris célpontok keresését. A molekuláris vizsgálatokba bevont kódoló és nem kódoló DNS-szakaszok szekvencia elemzése alapján terveztük a *B. australiensis*, *B. hawaiiensis* és *B. spicifera* fajok rendszertani helyzetének és rokoni kapcsolatainak tanulmányozását filogenetikai módszerek segítségével.
3. A *Cochliobolus* nemzetség humán kórokozó anamorf fajok jellemzéseként célul tűztük ki a rendelkezésünkre álló izolátumok szénasszimilációs spektrumának feltárását nagyszámú egyedi szénforrás alkalmazásával, morfológiai változások rögzítését, továbbá az esetleges differenciáló szénforrások meghatározását.
4. Vizsgálni kívántuk a gomba patogenitásában esetlegesen szerepet játszó extracelluláris enzimek termelésére való képességet is.
5. Célunk volt továbbá a klinikai izolátumok antifungális szerekekkel szembeni érzékenységeinek vizsgálata, illetve antifungális és koleszterinszint-csökkentőként ismert hatóanyagok kombinációinak a klinikai törzsekre gyakorolt hatásának vizsgálata.
6. Célul tűztük ki a *Bipolaris* nemzetség egyes tagjai által termelt, antimikrobiális hatású ophiobolin A és ophiobolin B vegyületek antifungális hatásának vizsgálatát a napjainkban használt gombaellenes szerekekkel szemben kevésbé érzékeny járomspórás gombákkal szemben. További célunk volt, hogy vizsgáljuk a gombaellenes hatás háttérében meghúzódó biológiai mechanizmusokat.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. A kísérletek során felhasznált törzsek

A kísérletek során felhasznált törzseket a 2. és 3. táblázat tartalmazza.

2. táblázat: A dolgozatban vizsgált, a *Cochliobolus-Bipolaris* csoportba tartozó izolátumok.

Fajnév ^a	Törzsgyűjteményi szám ^b	Származás / Megjegyzés
<i>Bipolaris</i> sp.	SZMC 13058	humán szaruhártyafekély; India
<i>Bipolaris</i> sp.	SZMC 13075	humán szaruhártyafekély; India
<i>Bipolaris</i> sp.	SZMC 13068	humán szaruhártyafekély; India
<i>Bipolaris</i> sp.	SZMC 13062	humán szaruhártyafekély; India
<i>Bipolaris</i> sp.	SZMC 13066	humán szaruhártyafekély; India
<i>Bipolaris</i> sp.	SZMC 21168	humán szaruhártyafekély; India
<i>Bipolaris</i> sp.	SZMC 13078	humán szaruhártyafekély; India
<i>Bipolaris</i> sp.	SZMC 13079	humán szaruhártyafekély; India
<i>Bipolaris</i> sp.	SZMC 13080	humán szaruhártyafekély; India
<i>Bipolaris</i> sp.	SZMC 21169	humán szaruhártyafekély; India
<i>Bipolaris</i> sp.	SZMC 13069	humán szaruhártyafekély; India
<i>Bipolaris</i> sp.	SZMC 13067	humán szaruhártyafekély; India
<i>Bipolaris</i> sp.	SZMC 13074	humán szaruhártyafekély; India
<i>Bipolaris</i> sp.	SZMC 13059	humán szaruhártyafekély; India
<i>Bipolaris</i> sp.	SZMC 13071	humán szaruhártyafekély; India
<i>Bipolaris</i> sp.	SZMC 13060	humán szaruhártyafekély; India
<i>Bipolaris</i> sp.	SZMC 13061	humán szaruhártyafekély; India
<i>Bipolaris</i> sp.	SZMC 13063	humán szaruhártyafekély; India
<i>Bipolaris</i> sp.	SZMC 13070	humán szaruhártyafekély; India
<i>Bipolaris</i> sp.	SZMC 13065	humán szaruhártyafekély; India
<i>Bipolaris</i> sp.	SZMC 13064	humán szaruhártyafekély; India
<i>Bipolaris</i> sp.	SZMC 13073	humán szaruhártyafekély; India
<i>Bipolaris australiensis</i>	CBS 172.57, SZMC 13086	<i>Oryza sativa</i> ; Vietnám (<i>Helminthosporium australiense</i> típusú törzs)
<i>Bipolaris australiensis</i>	CBS 705.71, SZMC 13087	talaj; India
<i>Cochliobolus australiensis</i>	BRIP 12112a, SZMC 13041	<i>Bromus catharticus</i> ; Ausztrália
<i>Cochliobolus australiensis</i>	BRIP 12844a, SZMC 13044	<i>Dactyloctenium radulans</i> ; Ausztrália
<i>Bipolaris hawaiiensis</i>	CBS 103.97, SZMC 13083	humán orrmelléküreg-gyulladás, szem- és központi idegrendszeri érintettséggel; Szudán
<i>Bipolaris hawaiiensis</i>	CBS 173.57, SZMC 13085	<i>Oryza sativa</i> ; Hawaii (<i>Helminthosporium hawaiiense</i> szüntípus)
<i>Bipolaris hawaiiensis</i>	CBS 297.94, SZMC 13084	ormelléküreg-gyulladás, féohifomikózis csontgyulladással; Svájc
<i>Cochliobolus hawaiiensis</i>	BRIP 12129a, SZMC 13042	<i>Chloris gayana</i> ; Ausztrália
<i>Cochliobolus hawaiiensis</i>	BRIP 28916b, SZMC 13056	<i>Chloris gayana</i> ; Ausztrália
<i>Bipolaris spicifera</i>	CBS 197.31, SZMC 13088	<i>Nicotiana tabacum</i> ; -
<i>Bipolaris spicifera</i>	CBS 246.62, SZMC 13081	gyapot örlemény; Skócia
<i>Bipolaris spicifera</i>	CBS 274.52, SZMC 13082	talaj; Spanyolország (<i>Brachycladium spiciferum</i> típusú törzs)
<i>Cochliobolus spicifer</i>	BRIP 28917a, SZMC 13057	-; Ausztrália
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	CBS 110.14, SZMC 13012	<i>Hordeum</i> sp.; Egyesült Államok

^a A táblázatban a fajok nevét úgy tüntettük fel, ahogy azt a különböző törzsgyűjteményekben azonosították.

^b Rövidítések: BRIP: Queensland Plant Pathology Herbarium, Ausztrália; CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Hollandia; SZMC: Szeged Microbial Collection, Magyarország.

3. táblázat: Az ophiobolin A és B antimikrobiális hatásának vizsgálata során felhasznált törzsek.

Fajnév	Törzsgyűjteményi szám ^a	Származás / Megjegyzés
<i>Gilbertella persicaria</i>	SZMC 11089	őszibarack; USA
<i>Gilbertella persicaria</i>	SZMC 11090	őszibarack; USA
<i>Mucor racemosus</i>	SZMC 1501	-; Szőlészeti és Borászati Kutatóintézet; Magyarország
<i>Micromucor ramannianus</i> var. <i>ramannianus</i>	NRRL 1296	-
<i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>reflexus</i>	CBS 117.43	<i>Hordeum vulgare</i> ; Hollandia
<i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>reflexus</i>	CBS 398.95, SZMC 13632	-
<i>Rhizopus niveus</i>	CBS 403.51, ATCC 52312	-; Japán (<i>Rhizopus niveus</i> típus törzs)
<i>Mucor racemosus</i>	SZMC 12046	-
<i>Mucor circinelloides</i> f. <i>lusitanicus</i>	ATCC 1216b, CBS 277.49(+), NRRL 3631(-), SZMC 12030	-
<i>Rhizomucor miehei</i>	CBS 360.92	akut mieloid leukémia, pneumónia; Ausztrália
<i>Rhizomucor pusillus</i>	ETH M4920	humán trachea; Svájc
<i>Rhizopus oryzae</i>	NRRL 1526, SZMC 13618	-; USA
<i>Rhizopus oryzae</i>	CBS 109.939	humán kután zigomikózis; Kanada
<i>Rhizopus oryzae</i>	NRRL 2908, ATCC 52310, CBS 128.08	-; Kína (<i>Rhizopus tritici</i> típus törzs)
<i>Rhizopus oryzae</i>	CBS 112.07, ATCC 56536, NRRL 3133	-; Hollandia (<i>Rhizopus oryzae</i> típus törzs)
<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>rhizopodiformis</i>	CBS 102. 277	humán rhinocerebrális zigomikózis;-

^a Rövidítések: ATCC: American Type Culture Collection, USA; BRIP: DPI&F Plant Pathology Herbarium, Ausztrália; CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Hollandia; ETHM: Swiss Federal Institute of Technology Culture Collection, Svájc; NRRL: Agricultural Research Service Culture Collection, USA.

4.2. A kísérletek során használt táptalajok és tenyésztési körülmények

4.2.1. A törzsek fenntartására és szaporítására alkalmazott táptalajok

PDA (burgonya-dextróz agar): 20 % burgonyakivonat; 2 % dextróz; 2 % agar.

PDB (burgonya-dextróz tápleves): 20 % burgonyakivonat; 2 % dextróz.

MEA (malátás táptalaj): 1 % glükóz; 0,5 % malátakivonat; 0,5 % élesztőkivonat; 1 % KH₂PO₄; 1,5 % agar.

A *Cochliobolus* törzsek tenyésztése PDA táptalajon, 28 °C-on, míg fenntartásuk ugyanezen a táptalajon, 4 °C-on történt. A járomspórás gombák tenyésztése MEA táptalajon a megfelelő tenyésztési hőmérsékleten, fenntartásuk az azonos táptalajon, 4 °C-on történt.

4.2.2. Az antimikrobiális tesztek során felhasznált tápközegek

SPEC (élesztőkivonat-pepton-glükóz tápoldat): 0,1 % élesztőkivonat; 0,05 % pepton; 2 % glükóz.

YEG (élesztőkivonat-glükóz táptalaj): 0,5 % élesztőkivonat; 1 % glükóz; 1,5 % agar.

RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) 0,3 mg/l L-glutaminnal kiegészítve, 0,165 M 4-morfolin-propánszulfonsav (MOPS, Sigma-Aldrich), pH 7.

4.2.3. A szénforráshasznosítás vizsgálat során alkalmazott táptalaj

MM (minimál táptalaj): 0,5 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,1 % KH_2PO_4 ; 0,05 % MgSO_4 ; 1,5 % agar; 0,2 % szénforrás.

4.2.4. Specifikus táptalajok az enzimaktivitások vizsgálatára.

Elasztáz aktivitás vizsgálatához: 0,05 % elasztin; 0,05 % *yeast-carbon-base* (Sigma-Aldrich); 0,01 % bengálvörös; 0,05 M bórsav; 1,5 % agar; pH 7,6.

Foszfolipáz aktivitás vizsgálatához: Sabouraud-dextróz agar; 1 M NaCl; 0,005 M CaCl_2 ; 1,5% agar; 8% tojássárgájával kiegészítve (Price és mtsi. 1982).

Keratináz aktivitás vizsgálatához:

A: 0,2 M NaH_2PO_4 ; 0,1 M citromsav; 0,01 % élesztőkivonat; 1 % toll-keratin szubsztrát; 1,5 % agar.

B: 0,25 % glükóz; 0,5 % élesztőkivonat; 0,1 % KH_2PO_4 ; 0,05 % Mg_2SO_4 ; 0,3 % NaNO_3 , 4 mg/ml keratin-azúr (Sigma-Aldrich).

A tápoldat optikai denzitását 405 nm-en mértük 7 nap, 37 °C, 200 rpm rázatott tenyésztést követően.

Lipáz aktivitás vizsgálatához: 0,5 % pepton; 0,3 % élesztőkivonat; 0,1 % tributirin; 1 % agar.

Proteáz aktivitás vizsgálatához: 2 % glükóz; 0,1 % KH_2PO_4 ; 0,05 % MgSO_4 ; 1 % BSA; 2 % agar; pH 7.

4.3. A kísérletek során használt primerek

A *Cochliobolus* törzsek szekvencia alapú meghatározásánál alkalmazott primerek:

Köztes átíródo elválasztó régió (internal transcribed spacer, ITS):

ITS1 (White és mtsi. 1990) 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'

ITS4 (White és mtsi. 1990) 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

Köztes intergénikus elválasztó régió (intergenic spacer, IGS):

invSR1R (Vilgalys és Hester 1990) 5'-ACTGGCAGAATCAACCAGGTA-3'

LR12R (Vilgalys és Hester 1990) 5'-GAACGCCTCTAAGTCAGAATCC-3'

Transzlációs elongációs faktor EF-1 α gén (*tef*):

983F (Rehner 2001) 5'-GCYCCYGGHCAYCGTGAYTTYAT-3'

2218R (Rehner 2001) 5'-ATGACACCRACRGCACRGTYTG-3'

β -tubulin gén (*tub*):

T12 (O'Donnell és Cigelnik 1997) 5'-AACAACTGGGCCAAGGGTCAC-3'

T22 (O'Donnell és Cigelnik 1997) 5'-TCTGGATGTTGTTGGGAATCC-3'

Kalmodulin gén (*cmd*):

cmd 5 (Hong és mtsi. 2005) 5'-CCGAGTACAAGGAGGCCTTC-3'

cmd 6 (Hong és mtsi. 2005) 5'-CCGATAGAGGTCATAACGTGG-3'

Random amplifikált DNS-polimorfizmus (RAPD) PCR reakcióhoz használt primerek:

OPE17 (Operon Technologies) 5'-GGCTTATGCC-3'

OPG19 (Operon Technologies) 5'-GTCAGGGCAA-3'

OPK16 (Operon Technologies) 5'-TCGGCGGTTC-3'

OPM18 (Operon Technologies) 5'-CTCGCTATCC-3'

OPR15 (Operon Technologies) 5'-TGGCGTCCTT-3'

4.4. A kísérletek során alkalmazott módszerek

4.4.1. Genomi DNS tisztítása. A vizsgált gomba törzsek genomi DNS tisztításához 10 mg micéliumot folyékony nitrogén segítségével dörzsmozsárban elporítottunk, majd az Epicentre MasterPureTM Yeast DNA Purification Kit használati útmutatójának megfelelően elvégeztük a kivonást.

4.4.2. DNS gélelektroforézis. A nukleinsavak elválasztását 0,8%-os agaróz/TAE gélen (40 mM Tris-ecetsav pH 7,6; 1 mM Na₂EDTA) történő gélelektroforézissel végeztük el. A nukleinsavak detektálása 0,5 μ g/ml koncentrációjú etídium-bromidos festést követően UV fényben történt. A fragmentumok méretének meghatározása 1 kb-os molekulasúly marker (GeneRuler, 1 kb DNA Ladder; Fermentas) segítségével zajlott.

4.4.3. PCR-reakcióelegyek és amplifikálási körülmények

Az ITS, IGS, *tef*, *tub* és *cmd* reakciók során alkalmazott reakcióelegy:

200 μ M dNTP mix (Fermentas)
1x *Dupla-Taq* puffer (ZenonBio)
2,5 mM $MgCl_2$ (ZenonBio)
1 μ M - 1 μ M specifikus primer
5 U *Dupla-Taq* DNS polimeráz (ZenonBio)
50 ng DNS kivonat

A RAPD-PCR során alkalmazott reakcióelegy:

250 μ M dNTP mix (Fermentas)
1x *Dupla-Taq* puffer (ZenonBio)
5 mM $MgCl_2$ (ZenonBio)
1 μ M - 1 μ M random primer
5 U *Dupla-Taq* DNS polimeráz (ZenonBio)
50 ng DNS kivonat

Az ITS-PCR reakció amplifikálási körülményei:

1 ciklus:	denaturálás	94 °C/ 2 perc
35 ciklus:	denaturálás	94 °C/ 30 másodperc
	primer kötődés	48 °C/ 40 másodperc
	láncszintézis	72 °C/ 40 másodperc
1 ciklus:	végző láncszintézis	72 °C/ 2 perc

Az IGS-PCR reakció amplifikálási körülményei:

1 ciklus:	denaturálás	94 °C/ 4 perc
35 ciklus:	denaturálás	94 °C/ 35 másodperc
	primer kötődés	68 °C/ 55 másodperc
	láncszintézis	72 °C/ 3 perc
1 ciklus:	végző láncszintézis	72 °C/ 3 perc

A *tef*-PCR reakció amplifikálási körülményei:

1 ciklus:	denaturálás	94 °C/ 4 perc
35 ciklus:	denaturálás	94 °C/ 45 másodperc
	primer kötődés	57 °C/ 30 másodperc
	láncszintézis	72 °C/ 1,5 perc
1 ciklus	végző láncszintézis	72 °C/ 2 perc

A *tub*-PCR reakció amplifikálási körülményei:

1 ciklus	denaturálás	94 °C/ 4 perc
35 ciklus:	denaturálás	94 °C/ 35 másodperc
	primer kötődés	57 °C/ 55 másodperc
	láncszintézis	72 °C/ 45 másodperc
1 ciklus	végző láncszintézis	72 °C/ 2 perc

A *cmd*-PCR reakció amplifikálási körülményei:

1 ciklus	denaturálás	94 °C/ 4 perc
35 ciklus:	denaturálás	94 °C/ 1 perc
	primer kötődés	55 °C/ 1 perc
	láncszintézis	72 °C/ 50 másodperc
1 ciklus	végző láncszintézis	72 °C/ 2 perc

A RAPD-PCR reakció amplifikálási körülményei:

1 ciklus:	denaturálás	94 °C/ 4 perc
3 ciklus:	denaturálás	94 °C/ 1 perc
	primer kötődés	35 °C/ 1 perc
	láncszintézis	72 °C/ 2 perc
35 ciklus:	denaturálás	94 °C/ 10 másodperc
	primer kötődés	40 °C/ 20 másodperc
	láncszintézis	72 °C/ 2 perc
1 ciklus:	végző láncszintézis	72 °C/ 2 perc

Az amplifikálásokat MJ Mini™ Personal Thermal Cycler (BIO-RAD) segítségével végeztük.

4.4.4. DNS izolálás agaróz gélből. A PCR során kapott DNS fragmentumokat tartalmazó gél részletet steril szikével UV lámpa alatt vágtuk ki a 0,8% agarózt tartalmazó gélből. A kivágott gélből a DNS-t a Gel-MTM Gel Extraction System (Viogene) kit segítségével nyertük ki a gyártó utasításainak megfelelően.

4.4.5. A DNS szekvenciák meghatározása és elemzése. Az ITS, IGS, *tef* és *tub* amplikonok szekvenciájának meghatározása ABI 3730xl típusú automata DNS szekvenátor (PE Applied Biosystem, AGOWA, Németország) segítségével történt a PCR reakciók során használt primerekkel a fragmentumok mindkét irányából történő szekvenálásával.

Az ITS, *tef* és *tub* szekvenciák esetén a kontigok összeszerkesztését a Staden programcsomag PreGap és Gap4 programjainak segítségével végeztük (Staden és mtsi. 2001), az IGS régió esetén nem álltak rendelkezésünkre megfelelően hosszú átfedő szekvenciák, így esetükben a két különböző irányból szekvenált fragmentumokat két önálló szekvenciaként kezeltük. A szekvenciákat a Proalign program (Roshan és Livesay 2006) segítségével illesztettük, kulcsoportként a *B. sorokiniana* SZMC 13012 törzset használtuk.

A filogenetikai analízisben az ITS, IGS, *tef* és *tub* szekvenciák, illetve a RAPD-PCR gélelektroforéziséből szerkesztett mátrix kombinációját használtuk. Az ITS és *tef* szekvenciák MrBayes analízisét 1×10^6 generáció, *burn-in* 5×10^3 , K2P modell beállításával végeztük. A Mr Bayes analízist az ITS + *tef* + *tub* + RAPD kombinált adatmátrixon 5×10^6 generáció, *burn-in* 2×10^4 , illetve az ITS + *tef* + *tub* + RAPD + IGS kombinált adatokon 5×10^7 generáció, *burn-in* 3×10^4 beállítások használatával, illetve a partíciókhoz legmegfelelőbb modelleket rendelve végeztük. A RAPD-PCR-ből származó adatok bináris mátrixba szerkesztéséhez az optimális kódolás megtalálása érdekében háromféle kódolási lehetőséget is számba vettünk. Az első kódolás során csak az erős, határozott sávok; a másodiknál a kevésbé erős, de még jól körülhatárolt sávok lettek kategorizálva. Az „1” kód esetén az adott elektroforetikus sáv megjelent az izolátumban, „0” kód esetén az adott sáv nem jelent meg a vizsgált izolátumban a gélfotón. A harmadik kódolás egy többállapotú (0, 1, 2) mátrix létrehozását takarja. Ez esetben a „2” kód jelentette az erős, határozott sáv meglétét; az „1” kód a gyenge, de az ismétlések során mindig megjelenő sávokat; míg a „0” az adott sáv hiányát jelezte. Minden primerrel többször is elvégeztük a RAPD-PCR-t és a gélelektroforézist, hogy megbizonyosodjunk a kísérletek reprodukálhatóságáról. Az optimális kódolás meghatározásához a különböző kódolású RAPD mátrixok Bayes MCMC analízisét végeztük el (MrBayes 1×10^6 generáció, *burn-in* 5×10^3 , egyparaméteres Markov modell), majd a maximum klád kredibilitási fákát a TreeAnnotator v 1.4.8 program (Drummond és Rambaut

2007) segítségével határoztuk meg. A Maximum klád kredibilitási fákat összevetettük az ITS + IGS + *tef* + *tub* azonos paraméterek mellett futtatott MrBayes analízise során létrejött többségi konszenzus fával. Mindkét esetben csak a magas támogatottságú csoportokat hasonlítottuk össze, mely alapján a nukleotidszekvenciák során létrejött csoportosítást legjobban reprezentáló RAPD kódolást választottuk ki a filogenetikai analízishez.

A filogenetikai elemzés során az egyes szekvenciákhoz legjobban illeszkedő modellt a ModelTest program (Posada és Crandall 1998) segítségével választottuk ki. Ennek megfelelően az ITS- és *tub*-szekvenciákhoz a K2P modell, a *tef*- és IGS- szekvenciákhoz a GTR+G modell, míg a RAPD mátrixhoz az egyparaméteres Markov modell (restrikciós hely modell) illet a legjobban. A Bayes szerinti MCMC analízist a MrBayes v 3.1.2 programmal (Huelsenbeck és Ronquist 2001) végeztük. Az MCMC analízisben négy Markov lánc futott 5×10^6 generáción keresztül, a *burn-in* érték 2×10^6 generációra lett beállítva. Fa mintavételezés minden 100. generációban történt, majd a *post-burn-in* fákból meghatároztuk a többségi konszenzus filogramot. A posztterior valószínűség értékét $\geq 0,95$ felett tekintettük szignifikánsnak.

4.4.6. Fénymikroszkópos vizsgálatok. A humánpatogén *Bipolaris* izolátumok konídiumának vizsgálatához a törzseket PDA tápközegen, 28 °C-on, 14 napig tenyésztettük. A telepek makroszkópikus vizsgálata után (telepmorfológia, szín) a konídiumok desztillált vizes mosása és hifatörmelékektől való szűrése következett. Ezek után minden izolátumból meghatároztuk 50-50 konídium szélességét, hosszúságát és szeptumszámát egy Zeiss Axiolab fénymikroszkóp segítségével. Az adatok statisztikai analízisében a szignifikanciát a *two-tailed* T-próbával állapítottuk meg.

4.4.7. Antimikrobiális érzékenységi tesztek.

4.4.7.1. A tesztekben vizsgált antifungális szerek. Az antifungális érzékenységi tesztek során a következő vegyületeket alkalmaztuk:

Azolok: Econazol (ECO; Aurozol, Aurolab), Flukonazol (FLU; Sigma-Aldrich), Itrakonazol (ITR; Sigma-Aldrich), Ketokonazol (KET; Sigma-Aldrich), Mikonazol (MCZ; Sigma-Aldrich).

Poliének: Amfotericin B (AMB; Sigma-Aldrich), Natamicin (NAT; Natamet, United Pharmacies).

Sztatinok: Atorvasztatin (ATO; Atorvox, Richter), Fluvasztatin (FLV; Lescol, Novartis), Lovasztatin (LOV; Mevacor, Merck), Szimvasztatin (SIM; Vasilip, Egis), Rozuvasztatin (ROS; Crestor, AstraZeneca).

Az ITR, KET és MCZ por alapú hatóanyagokat az előírásoknak megfelelően dimetil-szulfoxidban (DMSO), a FLU-t pedig dimetil-formamidban (DMF) oldottuk fel (NCCLS 2002). Az ECO és NAT szemcseppeket DMSO-val, míg az AMB oldatot vízzel hígítottuk a megfelelő koncentrációjú törzsoldat eléréséig. Az összes sztatín tabletta formájában állt rendelkezésünkre, melyeket metanolban oldottunk. A törzsoldatokat felhasználásig -80 °C-on tároltuk, kivéve a sztatínokat, melyeket minden alkalommal frissen készítettük el. A LOV és SIM lakton prodrogként kerül forgalomba, ezért ezeket használat előtt 60 °C-on 1 órán át 15% (v/v) etanol és 0,25% (w/v) NaOH alkalmazásával aktiválni kellett (Lorenz és Parks 1990).

4.4.7.2. Antifungális érzékenységi tesztek mikrotiter lemezen. Az antifungális szerek hatékonyságát vizsgáló, 96 helyes mikrotiter lemezen végzett *in vitro* mikrodilúciós teszteket a CLSI M38-A (2002) szabványnak megfelelően végeztük, mintahelyenként 200 µl végtérfogatban. A MIC értékeket a 620 nm-en mért abszorbancia értékek alapján házároztuk meg. A mikrotiter lemezek mintahelyeibe 100 µl 1×10^5 konídium/ml töménységű szuszpenziót pipettáztunk, melyeket PDA táptalajon nevelt humánpatogén *Bipolaris* izolátumok 7 napos tenyészetéből készítettünk el RPMI 1640 (pH 7,0; Sigma-Aldrich) tápoldatban. Az azolok és poliének esetében alkalmazott koncentráció tartomány a mikrotiter lemezen 0,6-32 µg/ml volt, kivéve a FLU esetében (0,125-64 µg/ml), míg a sztatínokat 0,39-25 µg/ml koncentráció tartományban vizsgáltuk. A tízlépcsős felező hígításnak megfelelő koncentrációkat a százszorosán tömény törzsoldatok 1:2 arányú oldószer, majd 1:50 arányú RPMI hígításával értük el. Minden lemez tartalmazott egy hatóanyagmentes növekedési kontrollt, oldószer kontrollt és egy steril, konídium- és hatóanyagmentes tápoldat kontrollt is. A mikrotiter lemezeket 30 °C-on 72 órán át inkubáltuk, az abszorbancia-értékeket 24 óránként mértük egy ASYS Jupiter mikrotiterlemez-olvasó segítségével (Asys HITECH GmbH.). Az adatok értékelésekor a hatóanyagmentes növekedési kontroll (a tápoldat kontroll OD értékének levonása után) jelentette a 100%-os növekedést (azaz 0%-os gátlást), amihez a különböző koncentrációjú hatóanyagokkal kiegészített tápoldatokban tapasztalt növekedést viszonyítottuk. A növekedés illetve gátlás mértékéből minden hatóanyagra nézve megállapítottuk a minimális gátló koncentrációt, azaz a MIC értéket. Azolok esetén a 80 %-os

gátlás is tekinthető MIC értéknek, de vizsgálatainkban minden hatóanyagra egységesen a 90 %-os gátlást határoztuk meg MIC értéknek.

4.4.7.3. Hatóanyag kombinációkkal szembeni érzékenység vizsgálata checkerboard titrálással. Az előzőekben leírtaknak megfelelően, szintén mintahelyenként 200 µl végtérfogatban végeztük a kísérleteket, annyi különbséggel, hogy az előzőhöz képest négyszeresen tömény törzsoldatokból indultunk ki. Az AMB-t és az azokat balról jobbra csökkenő koncentrációban, míg a sztatinokat fentről lefelé csökkenő koncentrációban vittük fel a mikrotiterlemezre, így minden mintahelyen más-más koncentrációban volt jelen a két hatóanyag. Az azokat 0,6-32 µg/ml, a sztatinokat 0,39-25 µg/ml, míg az AMB-t 0,03-16 µg/ml koncentráció tartományban vizsgáltuk.

4.4.7.4. A hatóanyagok közötti kölcsönhatás mértékének kiszámítása. Az OD értékekből a növekedési kontrollhoz viszonyítva kiszámoltuk az adott hatóanyagkombinációk által okozott növekedésgátlás mértékét, majd a hatóanyagok közötti kölcsönhatást kétféle módszerrel is meghatároztuk. Az egyik módszer az Abbott formula volt (Gisi 1996), ahol a kölcsönhatás mértékét (IR) a következő formula alapján számoltuk: $IR = I_o / I_e$, ahol I_o egy adott kombinációban megfigyelt, míg I_e az adott kombinációban várt gátlásszázalékot jelentette. A várt gátlásszázalékot a következő képlet segítségével számoltuk ki: $I_e = X + Y - (XY / 100)$, ahol X és Y a hatóanyagok gátlásának mértéke volt egyedüli alkalmazásuk esetén, míg az XY érték az adott koncentrációban alkalmazott kombinációk esetén megfigyelt gátlás mértékét jelentette. Az IR értékéből a kölcsönhatás természetére következtettünk: a kölcsönhatás antagonista volt, amennyiben $IR < 0,5$; ha $0,5 < IR < 1,5$ ha a kölcsönhatás additív; míg, ha $IR > 1,5$ szinergista kölcsönhatásról beszélhetünk. A hatóanyagok közötti gátlás mértékét a frakcionális gátlási koncentráció index (FICI) segítségével is meghatároztuk, mely a $FICI = FIC A + FIC B = (A / MIC A) + (B / MIC B)$ formulával számolható ki. A formulában A és B a hatóanyagok kombinációban megfigyelt MIC értékeit, míg a MIC A és MIC B jelölések a hatóanyagok egyedüli alkalmazásakor megfigyelt MIC értékeket jelentik. A kölcsönhatás típusa szinergista, ha $FICI \leq 0,5$; ha $0,5 < FICI < 1$ a kölcsönhatás additív; ha $1 < FICI < 4$ a kölcsönhatás indifferens; míg $FICI \geq 4$ esetén a kölcsönhatás antagonista (Hall és mtsi. 1983).

4.4.8. Szénforráshasznosítási vizsgálat. A szénforráshasznosítási teszteket 63 féle vegyület alkalmazásával végeztük el, melyben az MM táptalajt 0,2 % szénforrással egészítettük ki (Vágvölgyi és mtsi 1996). A 10^5 töménységű konídiumszuszpenziókból 20 µl-t

cseppentettünk minden egyes csészére, melyeket 25 °C-on, 5 napig inkubáltunk. Növekedési kontrollként a glükóz, míg a háttérnövekedés követésére a szénforrásmentes MM táptalajt alkalmaztuk. Kiértékelés során a glükóz tartalmú növekedési kontrollt +++-al, míg a MM táptalajon tapasztalt háttérnövekedésnek megfelelő növekedést 0-val jelöltük. A két érték között tapasztalható eltérő mértékű növekedéseket + és ++ kategóriákba soroltuk. Egyes vegyületek esetén a háttérnövekedésnek megfelelő hifaszövedék sem fejlődött, ezesetben a vegyületet gátló hatásúnak tekintettük és – jellel láttuk el.

Az egyedi szénforrásként alkalmazott vegyületek a következők voltak:

L-alanin, almasav, L-arabinóz, L-arginin, aszkorbinsav, L-aszparaginsav, cellobióz, cisz-akonitsav, L-cisztein, L-citrullin, dextrán, eritrit, etanol, L-fenilalanin, D-fruktóz, fumársav, galaktitol, galluszsav, glicerin, glicerol-1-monoacetát, glicerol-1-monohidrát, L-glicin, glükonsav, 5-keto-D-glükonsav, D-glükóz, L-glutamin, L-glutaminsav, L-hisztidin, inozin, inulin, L-izoleucin, keto-izovaleriánsav, keményítő, laktóz, L-leucin, L-lizin, D-lixóz, maltóz, mannit, D-mannóz, melibióz, L-metil-mannozid, L-metionin, mio-inozit, ornitin, orotsav, pirooszólósav, L-prolin, protokatechusav, raffinóz, L-ramnóz, D-szacharóz, L-szerin, szorbit, L-szorbóz, L-tirozin, L-treonin, L-triptofán, L-valin, vanillin, xilán, xilit, α -metil-D-xilozid, D-xilóz.

4.4.9. Extracelluláris enzimtermelés vizsgálata. Az extracelluláris elasztáz, foszfolipáz, keratináz, lipáz és proteáz aktivitást 4.2.4 fejezetben felsorolt specifikus táptalajokon vizsgáltuk. A táplemezekre 10^5 konídium/ml töménységű szuszpenzióból 20 μ l-t oltottunk ki csepp formájában. A lemezeket 7 napig inkubáltuk 30 °C-on, az enzimaktivitás hatására keletkező feloldási zóna megjelenését és méretét 24 óránként ellenőriztük.

4.4.10. Ophiobolin vegyületek elválasztása és tisztítása. Az ophiobolin A 95 %-os tisztaságú vegyülete gyári formában rendelkezésünkre állt (Sigma-Aldrich), míg az ophiobolin B-t PDB-n, 6 napon keresztül, 28 °C-on tenyésztett *Bipolaris* sp. tenyészközegéből 1:1 arányú dietiléteres extrakcióval nyertük ki, majd preparatív vékonyréteg kromatográfia (TLC) segítségével választottuk el. A preparatív TLC során a mintát F₂₅₆ (Merck) szilikagélen futtattuk, majd az ophiobolin B-t UV fényben detektáltuk, majd a megfelelő sávot kimetszettük a szilikagélből és etilacetátban lemostuk róla az ophiobolin B-t. Az ophiobolin B-t nagy felbontású folyadék kromatográfiás vizsgálat segítségével (HPLC) azonosított standarddal határoztuk meg. Az antimikrobiális tesztekben használt ophiobolin A

és ophiobolin B törzsoldatokat 10 %-os metanolban készítettük el. A 10 %-os metanol korábbi vizsgálatok alapján önmagában nem okoz morfológiai változást a kezelt sejteken.

4.4.11. Az ophiobolinok antifungális hatásának vizsgálata mikrotiter lemezen. Az ophiobolin A és B *in vitro* antifungális hatásának vizsgálatát a 3. táblázatban felsorolt gombákkal szemben végeztük el 96 helyes mikrotiter lemezen, SPEC tápoldatban. A mikrotiter lemezek mintahelyei 1,587-100 µg/ml koncentráció tartományban tartalmazták a törzsoldatból hétlépcsőben felező hígítással készített ophiobolin A-t és B-t külön-külön, továbbá a tesztelt törzsek $1-5 \times 10^4$ spóra/ml töménységű szuszpenzióját is összesen 200 µl végtérfogatban. Növekedési kontrollként hatóanyag nélküli, spóraszuszpenzióval leoltott SPEC tápoldatot alkalmaztunk. Az abszorbanciát ASYS Jupiter HD mikrotiter lemez leolvasó (ASYS HITECH GmbH) készülékkel mértük 24 óránként 620 nm-en, a 3 napon keresztül, izolátumtól függően 35 vagy 25 °C-on inkubált mikrotiterlemezekből. Minden mikrotiterlemez tartalmazott hatóanyagmentes növekedési kontrollt, oldószer kontrollt és spóraszuszpenzió nélküli RPMI kontrollt is. Az ophiobolin A-ra és ophiobolin B-re vonatkozó MIC értékeket a mért optikai denzitások alapján határoztuk meg a növekedési kontrollhoz képest.

4.4.12. Az ophiobolin vegyületek hatására bekövetkező apoptotikus jellegű morfológiai változások vizsgálata. A *Mucor circinelloides* ATCC 1216b és a *Rhizopus stolonifer* var. *reflexus* CBS 117.43 izolátumok különböző koncentrációjú ophiobolinnal (1,6; 3,2; 6,25; 12,5 µg/ml) kiegészített YEG táptalajon nevelt tenyészetének morfológiai változásait, 24 óra inkubáció után vizsgáltuk fénymikroszkóppal.

A morfológiai változásokat okozó mechanizmusok vizsgálatához YEG tápoldatban tenyésztettük az izolátumokat, melyeket különböző időpontokban egészítettünk ki az ophiobolin vegyületekkel. Az egyik sorozatban a sporangiospórák YEG tápoldatba oltásával egyidőben a megfelelő koncentrációjú ophiobolint is a tápoldathoz kevertük (0 órás tenyészet), míg a másik sorozatban a sporangiospórák csírázásának megindulását követően, azaz a spóraszuszpenzió leoltása után 4 órával adtuk a vegyületet a tenyészethez (4 órás tenyészet). Az ophiobolinok okozta morfológiai változásokat a hatóanyagok tápoldathoz való adagolását követően 5 órával vizsgáltuk. Minden tenyészet esetén 1×10^5 spóra/ml töménységű szuszpenziót oltottunk le. Minden kezelt tenyészet mellett egy hatóanyagmentes kontrollt is vizsgáltunk. A tenyészeteket az apoptózis detektáló kit (Sigma, APOAF) instrukcióinak megfelelő annexin-V-fluoreszcein izotiocianátos (FITC) festést követően

fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk. A sejtmagok festése 1 ml végtérfogatban 0,1 µg/ml 4'-6-diamidino-2-fenilindolt (DAPI) tartalmazó oldatban történt szobahőmérsékleten 30 percig. A festést követően a sejteket kétszer mostuk desztillált vízzel a nem kötődött festék eltávolítása végett. A morfológiai változásokat Zeiss Jenalumar fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk U 205 g excitációs szűrő, G-244 barrier szűrő és 510 nm dichroikus szűrő segítségével.

5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELESLÉSEK

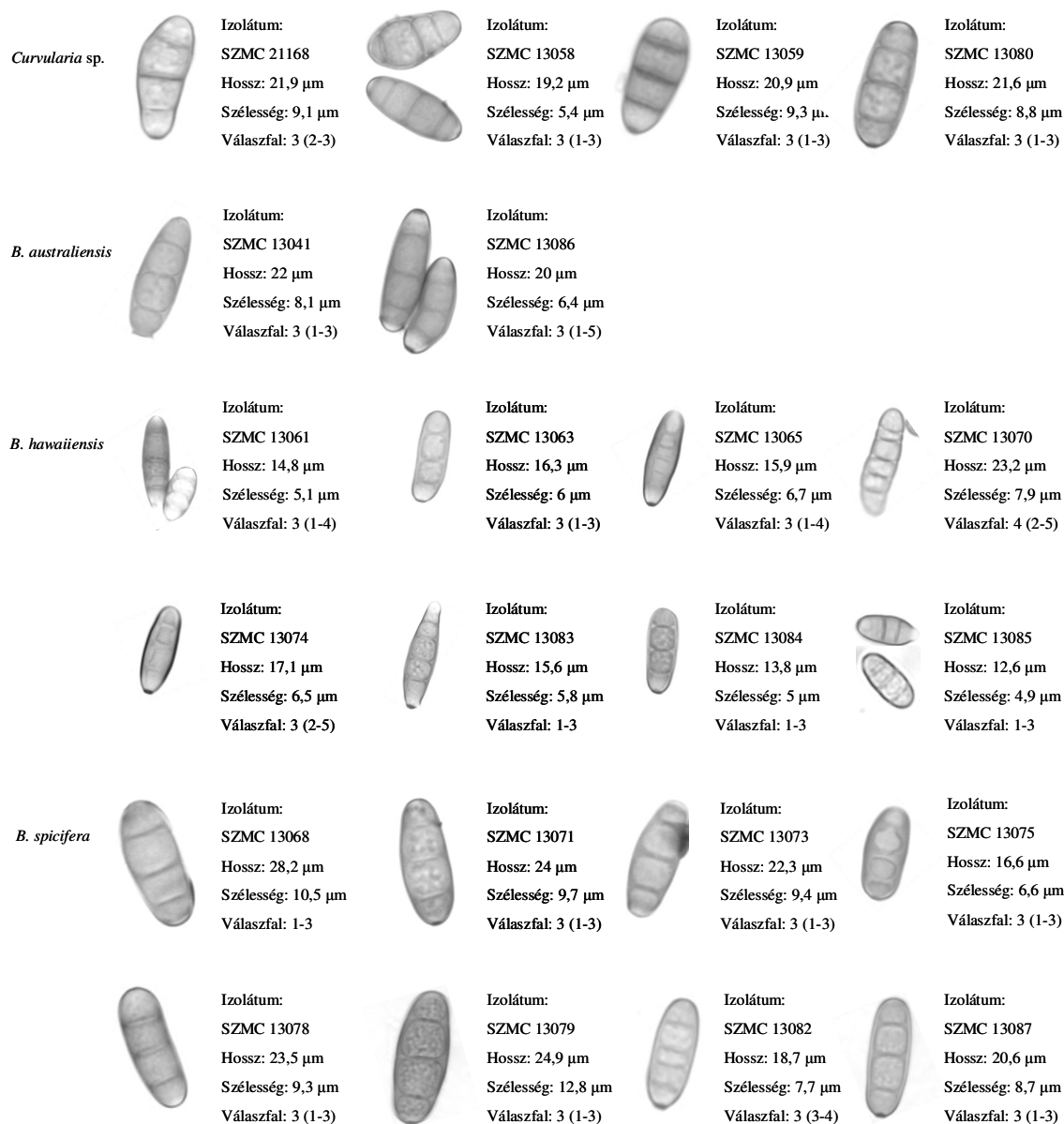
5.1. A humán kórokozó *Cochliobolus* fajok azonosításában használt morfológiai markerek vizsgálata

A *Bipolaris* és *Curvularia* nemzetségekhez tartozó fajok elkülönítése napjainkban is elsősorban morfológiai karakterek alapján történik. Diagnosztikai szempontból a konídiumok méretét és válaszfalainak számát tartják a legfontosabb határozóbélyegnek (McGinnis és mtsi. 1986, Fothergill 1996, Saubolle és Sutton 1996, Saenz és mtsi. 2001, Buzina és mtsi. 2003, Saha és Das 2005, Eghtedari 2006, Chowdhary és mtsi. 2011). Felülvizsgáltuk a karakterek használhatóságát a rendelkezésünkre álló 38 izolátum közül 22 törzs esetében. Közülük 15 humán keratomikózisból, 7 törzs pedig - melyek között az opportunistá patogén *Bipolaris* izolátumok típus-törzsei is szerepeltek - törzsgyűjteményből (CBS, BRIP) származott. A vizsgálatokból 16 törzset elégtelen konídiumképzésük miatt kizárunk. A 4. ábrán a *Bipolaris* és *Curvularia* nemzetséghez tartozó konídium alakok, illetve azok metrikus adatai láthatóak.

A vizsgált, keratomikózisból származó izolátumok közül az SZMC 13058, 13059, 13080 és 21168 *Curvularia* sp.-nek bizonyult. A négy izolátum közül háromnál megfigyelhető volt a *Curvularia* nemzetségre jellemző központi sejtmegvastagodás és az ebből adódóan enyhén hajlott konídium, továbbá a középen elhelyezkedő szeptum is sötétebb színű volt, mint a külső részekben (Guarro és mtsi. 1999). A *Curvularia* sp. SZMC 13080 izolátum konídiumai közt találtunk egyenes, hengeres alakú, illetve enyhén megvastagodott, disztális sejttel rendelkező konídiumot. A *B. australiensis*-ek közé, a morfológiai vizsgálatok alapján, két izolátum tartozott, mindkettő törzsgyűjteményből származott. A nyolc *B. hawaiiensis* izolátum közül öt származik humán szaruhártya gyulladásból és három (SZMC 13083, 13084, 13085) törzsgyűjteményből, míg a vizsgált nyolc *B. spicifera* törzs közül hatot izoláltak keratitiszből, kettő pedig (SZMC 13082, 13087) törzsgyűjteményből érkezett.

A három típus-törzs konídiumainak átlagolt méreteit összevetve a *B. australiensis* CBS 172.57 (SZMC 13086) és *B. spicifera* CBS 274.52 (SZMC 13082) esetén nagyon hasonló értékeket kaptunk, a *B. hawaiiensis* CBS 173.57 azonban jelentős mértékben eltért a másik két törzstől. A *B. hawaiiensis* CBS 173.57 típus-törzs konídiumainak átlagos hosszúsága 12,7 μm , szélessége 4,9 μm , míg a *B. spicifera* CBS 274.52 (SZMC 13082) törzs konídiumai átlagosan 18,7 μm hosszúak és 7,7 μm szélesek, a *B. australiensis* CBS 172.57 (SZMC 13086) konídiumai pedig átlagosan 20 μm hosszúak és 6,4 μm szélesek. A három típus-törzs hosszúság és szélesség értékeit kétmintás egyenlő varianciájú T-próbával vizsgálva, a *B. spicifera* CBS 274.52 (SZMC 13082) és a *B. australiensis* CBS 172.57 (SZMC 13086) közti

különbség nem szignifikáns, míg a *B. hawaiiensis* CBS 173.57 (SZMC 13085) konídium méretei szignifikánsan eltérnek a másik két típusától.



4. ábra: A morfológiai vizsgálatokba bevont *Bipolaris* és *Curvularia* nemzetséghez tartozó konídium alakok, illetve a hosszúság és szélesség mérése során megállapított átlagos értékek és a válaszfalak száma.

A konídiumméretek és szeptumszámok alapján is a *Curvularia* izolátumok mutatják a legegységesebb képet. A törzsgyűjteményben *B. australiensis*-ként azonosított izolátumokat azonban morfológiai karakterek alapján nem lehet elkülöníteni a *Curvularia* izolátumoktól. A *B. australiensis* izolátumok konídiumainak átlagos hossza 21 µm, a *Curvularia*-ké 20,9 µm,

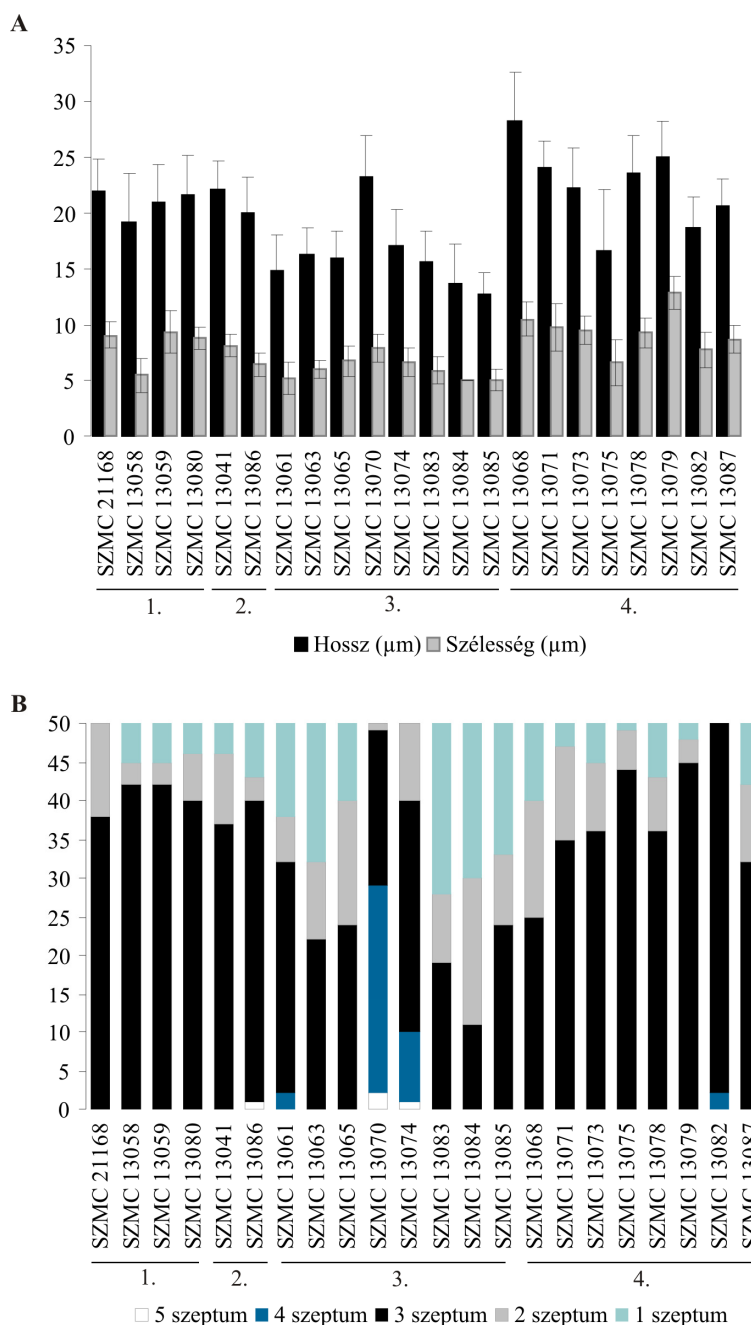
míg szélessége a *B. australiensis*-ek esetén átlagosan 7,2 μm , *Curvularia* izolátumoknál 8,2 μm . Nincs olyan izolátum, amely jelentősen eltérne az átlagos értékektől. Szeptumszámukat illetően, mindkét csoport tagjai túlnyomó többségben 3 válaszfalat képeznek, csak a mintaszám kis részét képezik 1 vagy 2 válaszfallal rendelkező konídiumok. Az **5. ábrán** láthatók a vizsgált izolátumok konídiumméretének átlagértékei és szeptumszámaik.

A *B. hawaiiensis* izolátumok, ahogy a típustörzsek esetén látott szignifikancia vizsgálat is mutatja, szignifikánsan kisebbek és keskenyebbek, mint a másik két *Bipolaris* faj és a *Curvularia* nemzetség izolátumai, emellett – meglepő módon – konídiumaik szeptumszáma is lényegesen alacsonyabb volt a többi fajnál látottakhoz képest. A *B. hawaiiensis*-hez tartozó izolátumok átlagosan 5,9 μm szélesek és 16,6 μm hosszúak. Ettől az SZMC 13070 izolátum tér el jelentősen, mely átlagos szélessége 7,9 μm , hosszúsága 23,2 μm (**5. ábra**). A konídiumokban található válaszfalak száma terén ennél változatosabb a kép. Nem lehetett meghatározni egy, az izolátumokra általánosan jellemző szeptumszámot. Az SZMC 13063 és SZMC 13074 izolátumok konídiumainak többségében 3 válaszfalat, míg a SZMC 13074 konídiumainak többségében 4 válaszfalat számoltunk. Az SZMC 13063, 13083 és 13085 esetén az egy és három szeptumos konídiumok száma nagyjából megegyezik, míg az SZMC 13065 és 13084 izolátumok esetén a két és három válaszfallal rendelkező konídiumok aránya egyenlő. Az izolátumok többségére a kevés válaszfal (1-3) képzése jellemző, az SZMC 13061, 13070 és 13074 izolátumoknál azonban a négy és öt válaszfallal rendelkező konídiumok sem ritkák.

A *B. spicifera* izolátumokra átlagosan 22,4 μm konídium hossz és 9,3 μm szélesség jellemző a, amelytől azonban jelentősen eltér az átlagosan 16,6 μm hosszú és 6,6 μm széles SZMC 13075, és a 18,7 μm hosszú és 7,7 μm széles konídiumokat képző SZMC 13082 izolátum. Ez utóbbi két izolátum méretét tekintve inkább a *B. australiensis* és *B. hawaiiensis* izolátumokhoz hasonló. A szeptumszámokat tekintve, a *B. spicifera* izolátumok általánosan 3 szeptumot képeznek, de ritkán előfordulnak 4 válaszfallal rendelkező konídiumok is, ahogy az SZMC 13082 esetében is látható. A túlnyomó többségében három válaszfalú konídiumot képző izolátumok mellett, az SZMC 13068, 13071 és 13087 izolátumok esetén magas a kétsejtes konídiumok aránya is (**5. ábra**).

Morfológiai vizsgálat alapján egyedül a *B. hawaiiensis* izolátumok azonosíthatók egyértelműen. A *B. australiensis* és *B. spicifera* izolátumok konídiumainak alakja, hosszúsága, szélessége és válaszfalaik száma nagyrészt átfedő értékeket mutat, így pontos azonosításra ezek a karakterek nem alkalmasak. A *Curvularia* izolátumok konídiumai, bár méretüket tekintve az előbb említett két *Bipolaris* fajjal megegyeznek, alakjukat tekintve a

disztális sejt megvastagodása miatt nemzetségi szinten jól elkülöníthetők a *Bipolaris*-októl. A *Curvularia* izolátumok fajsztíntű azonosítására a dolgozat nem tér ki.



5. ábra: A: Izolátumonként 50 konídium hosszúságának és szélességének átlagértékei, a hozzájuk tartozó szórás értékekkel. **B:** A konídiumokban meghatározott septonyszámok eloszlása (darabszám). A diagramok alatti vonalak, a számokkal jelölt fajcsoportokhoz tartozó izolátumokat foglalják csoportba. 1. *Curvularia* sp., 2. *B. australiensis* (típustörzs: SZMC 13086), 3. *B. hawaiiensis* (típustörzs: SZMC 13085), *B. spicifera* (típustörzs: SZMC 13082).

Eredményeinket irodalmi adatokkal összehasonlítva, jelentős eltérést tapasztaltunk a *B. hawaiiensis* izolátumok konídiumainak méretét és szeptumszámát illetően. Méréseinkben a *B. hawaiiensis* izolátumok átlagosan 16,6 µm hosszú és 5,9 µm széles konídiumokat képeztek, általában három válaszfallal, de ez utóbbi nagy különbségeket (1-6) mutatott izolátumtól függően. Ezzel szemben a klinikai *Bipolaris* fajok azonosítását legalaposabban összefoglaló tanulmányukban McGinnis és munkatársai (1986) lényegesen nagyobb értékeket mértek *B. hawaiiensis* izolátumok esetén. Az általuk tapasztaltak szerint, a *B. hawaiiensis* törzsek átlagos konídium hossza 23,3 µm, míg szélessége 6,8 µm, emellett tipikusan 4-5 válaszfalat képeztek. Schell (2002) hasonló eredményről számolt be. A **4. táblázat** foglalja össze a McGinnis és munkatársai (1986), illetve az általunk végzett mérési eredményeket. A tenyésztést azonos tápközegben és körülmények között végeztük.

4. táblázat: A humán patogén *Bipolaris* fajok vizsgálata során megállapított konídium méretek és szeptumszámok átlagértékei a McGinnis és mtsi. (1986) szerinti és az általunk végzett vizsgálatokban. Zárójelben láthatók az értéktartományok, melyen belül az adott izolátumhoz tartozó konídiumok mérete változott.

Fajok	Konídium paraméterek	McGinnis (1986)	Saját mérés
<i>B. australiensis</i> (izolátumok száma: McGinnis: 3, Krizsán: 2)	Hossz (µm)	23,2 (14-34)	21 (13,8-27,5)
	Szélesség (µm)	8,3 (6-13)	7,3 (5-10)
	Válaszfalak száma	tipikusan 3 válaszfal, 10%-ban található 4-5 válaszfal	többségében 3 válaszfal, ritkán 4 válaszfalszeptumos (1-4)
<i>B. hawaiiensis</i> (izolátumok száma: McGinnis: 13, Krizsán 8)	Hossz (µm)	23,3 (16-34)	16,6 (10,6-17,5)
	Szélesség (µm)	6,8 (4-9)	5,9 (5-7,5)
	Szeptumszám	tipikusan 4-5 válaszfal, de 3-6 között változhat	többségében 3 válaszfal, ritkán 4-6 válaszfal (1-6)
<i>B. spicifera</i> (izolátumok száma: McGinnis 39, Krizsán 8)	Hossz (µm)	26,5 (16-39)	22,4 (15-33,8)
	Szélesség (µm)	9,6 (6-13)	9,3 (6,2-12)
	Szeptumszám	túlnyomórészt 3 válaszfal, ritkán 2 vagy 4	túlnyomórészt 3 válaszfal, ritkán 4 is előfordul (1-4)

Az általunk mért értékek a *B. australiensis* és *B. spicifera* fajok esetében jó egyezést mutatnak a McGinnisék által mért adatokkal. A *B. hawaiiensis* fajok esetén tapasztalt eltérést eleinte a nem megfelelő tenyésztési körülményeknek tulajdonítottuk, de többszöri ismétlést követően is mindig a leírtaknak megfelelő átlagos értékeket kaptuk. A sok egy- és

kétszeptumos konídium miatt feltételeztük, hogy a 2 hetes tenyésztési idő nem volt elég a normális konídiumképzéshez, ezért 4 hetes inkubáció után is elvégeztük a méréseket mindhárom típus törzs esetén. Ismételten a táblázatban rögzítettekhez hasonló eredményeket kaptunk, ezért kijelenthető, hogy az irodalmi adatoktól való eltérést *B. hawaiiensis* izolátumok esetén nem a tenyésztési körülmények okozzák. Feltételezésünk szerint a laboratóriumi fenntartás is okozhat változást a konídiogenezisben, melynek hatására az izolátumok kisméretű és kevés válaszfalú konídiumokat képezhetnek.

A morfológiai vizsgálatok tapasztalatai azt mutatják, hogy az azonosításban jelenleg használt morfológiai bélyegek (konídium alak, hossz, szélesség, válaszfalak száma) alapján a *B. hawaiiensis* ugyan elkülöníthető a többi *Bipolaris*-tól, azonban nem lehet különbséget tenni a *B. spicifera* és *B. australiensis* fajok izolátumai között. A *Curvularia* fajok konídiumai bár méretben megegyeznek az utóbbi két fajjal, a konídium alakja alapján jól elkülöníthetők a *Bipolaris* nemzetségtől. Tehát megállapíthatjuk, hogy a humán kórokozó izolátumok pontos azonosításához az alaktani vizsgálatok mellett egyéb, főként molekuláris módszerek használata is szükséges.

5.2. Humánpatogén *Bipolaris* fajok megkülönböztetésére alkalmas molekuláris karakterek azonosítása

5.2.1 A klinikumban jelentős *Bipolaris* fajok szekvencia-alapú azonosítása

A molekuláris munkákba 35 izolátumot vontunk be, melyek közül 22 származott keratomikózisból, míg 13 törzs a CBS és BRIP nemzetközi törzsgyűjteményekből érkezett.

A vizsgálatok során a *B. australiensis* CBS 172.57 (SZMC 13086), a *B. hawaiiensis* CBS 173.57 (SZMC 13085) és a *B. spicifera* CBS 274.52 (SZMC 13082) típus törzseket választottuk a három vizsgált *Bipolaris* faj referenciatörzseinek. A molekuláris markerek azonosítása érdekében PCR segítségével amplifikáltuk, majd szekvenáltuk a törzsek kalmódulin (*cmd*), transzlációs elongációs faktor 1 α (*tef*), tubulin (*tub*), magi riboszómális RNS-t kódoló köztes átíró elválasztó régió (ITS), illetve a magi riboszómális RNS-t kódoló intergénikus elválasztó régió (IGS) szakaszait. A molekuláris markerek azonosítása céljából minden kijelölt szekvenciárészletre illesztést végeztünk a referenciatörzsekkel, majd az így azonosított eltérő pozíciókat ellenőriztük az általunk szekvenált törzsgyűjteményi és keratomikózisokból származó izolátumok szekvenciáin. Amelyik génhez találtunk az NCBI GenBank adatbázisban elérhető szekvenciát, azokon is elvégeztük az eltérő pozíciók

tesztelését. Az eltérő pozíciók több izolátumra is kiterjedő tesztelése során határoztuk meg a nagy valószínűséggel fajspecifikusnak tekinthető markereket. A fajspecifikus markereket a referenciatörzsek illesztésén keresztül mutatjuk be, melyek helyzetét a szekvenciában a referenciatörzsek illesztésénél feltüntetett pozíciószámok jelölik (**1. sz. melléklet**).

A **1. számú melléklet**ben feltüntetett molekuláris markerek azonosításához készített illesztésben a DNS szakaszok sorrendje és nukleotid hossza a következő: *tef* (1-750), ITS régió (751-1138), az IGS régió LR12R indítószekvenciával (IGS 1; 1139-2233) és invSR1R indítószekvenciával (IGS 2; 2234-3066) felszaporított részletei.

A keratomikózisból származó *Cochliobolus* fajok elkülönítésére alkalmas szekvenciárészletek azonosításának első lépéseként, a gombák fajszintű azonosításában általánosan használt (Korabecna 2007) és gomba „barcode”-ként javasolt (Schoch és mtsi. 2012) ITS régió szekvenciáját vizsgáltuk. A régió általunk elemzett szakasza tartalmazta a variábilis ITS 1 (szekvenciánként változó, 135-143 bp hosszú) és ITS 2 (törzsenként változó, 90-130 bp hosszú) szakaszokat, illetve a konzervált 5,8S rDNS-t (157 bp). Az ITS 1 szakasz meglepő módon nem mutatott eltérést a különböző fajokhoz tartozó izolátumok között. Az ITS 1 szakaszán egyetlen olyan nukleotid pozíció volt, mely egyértelműen megkülönböztette a *B. australiensis* izolátumokat. (**6. ábra**).

ITS	976	1134
<i>B. spicifera</i>	A	C/T
<i>B. australiensis</i>	C	C/T
<i>B. hawaiiensis</i>	A	G

6. ábra: Az ITS régió opportunistá patogén *Bipolaris* fajokat elkülönítő motívumai a referenciatörzsek illesztésével szemlélítve. A régió kevés differenciáló karaktert hordoz, az ITS 1 és ITS 2 szakaszokon összesen két megkülönböztető karaktert hordozó szakaszt sikerült azonosítani. A *B. australiensis* és *B. spicifera* izolátumokban citozin és timin is előfordult az 1134 helyen, de guanin egyetlen esetben sem.

Az ITS 2 szakaszon a *B. hawaiiensis* elkülönítésére alkalmas motívumot sikerült azonosítani (**6. ábra**). Összességében elmondható, hogy az ITS régió nem hordoz mindhárom faj elkülönítéséhez elegendő mennyiségű megkülönböztető karaktert. A három fajazonosításban használható motívum közül kettő egynukleotidos különbség, mely szekvenálási hibából is adódhat, ezáltal téves eredményhez vezethet. Továbbá elmondható, hogy a három motívum együttesen is csak a *B. hawaiiensis* faj elkülönítésére hordoz elegendő

információt. Az ITS régió humánpatogén *Bipolaris* izolátumok fajszintű besorolása esetén történő kizárólagos alkalmazásának aggályait erősíti Fryen és munkatársai (1999) ITS-RFLP vizsgálata, melyben, az általunk kapott eredményhez hasonlóan, csak a *B. hawaiiensis* izolátumokat elkülönítő mintázatot tudtak azonosítani. Emellett Buzina és munkatársai. (2003) szinusztisz esetleírásában a morfológiai vizsgálatokat megerősítendő, ITS-PCR-t és hasonlóságkeresést is végzett az NCBI BLAST programmal. Eredményként a kórokozót 100 %-os bizonyossággal *B. spiciferaként* azonosították. Az ITS régió általunk végzett elemzésének tapasztalatai miatt, a *B. spiciferaként* meghatározott és a génbankban AY253918 kóddal jelölt szekvenciával (Buzina és mtsi. 2003) megismételtük a BLAST keresést. Eredményként valóban 100 %-os egyezést kaptunk első találatként egy *B. spicifera* törzsszel, azonban szintén 98-100 %-os egyezést kaptunk számtalan *B. australiensis* és *B. hawaiiensis*, de egyéb távolabbi rokon *Bipolaris* fajokkal is (teljes terjedelmű szekvenciaegyezés az első *B. spicifera* találat esetén volt, a többi fajnál 99 %-os szekvenciaáegyezés mellett tapasztaltuk az említett hasonlósági százalékokat). Egy amerikai klinikákon izolált *Bipolaris* törzsek morfológiai és ITS alapú diverzitás vizsgálatával foglalkozó tanulmány a mintegy 100 izolátum többségét alkotó *B. spicifera* és *B. hawaiiensis* törzsek mellett humán fertőzésekben az ITS régió hasonlóságkeresésére alapozva elsőként írt le a *B. cynodontis*, *B. microsporus* és *B. setariae* fajokat (da Cunha és mtsi. 2012). Az előzőekben tárgyaltak alapján, azonban erősen megkérdőjelezhető, hogy a da Cunha és munkatársai, illetve más morfológiára és ITS régió hasonlóságkeresésére alapozott tanulmányok által azonosított izolátumok ténylegesen az adott fajhoz tartoznak-e (Buzina és mtsi. 2003, Castelnuevo és mtsi. 2004, Toul és mtsi. 2006, Dyer és mtsi. 2008, da Cunha és mtsi. 2012). Az ITS régióról már bebizonyosodott, hogy *Aspergillus* nemzetség esetében sem használható fajazonosításra, mivel nem hordoz elegendő, a fajokat megkülönböztető karaktert. Az *Aspergillus* izolátumok azonosítására ezért a *tef* és kalmodulin szakaszok használata ajánlott (Geiser és mtsi. 2007).

Ezek alapján indokoltnak láttuk további DNS szakaszok vizsgálatát az opportunistá humán patogén *Bipolaris* fajok elkülönítésére alkalmas motívumok azonosítása céljából.

Felszaporítottuk és megszekvenáltuk a β -tubulin gén 637 bp-os részletét és a kalmodulin gén 555 bp-os szakaszát, ezekben azonban egyetlen fajspecifikus különbséget sem tudtunk azonosítani.

Az elongációs faktor 1 α alegység (*tef*) 750 bp-os részletének vizsgálata során összesen négyféle, egy-egy bázispárnyi, egyedül a *B. hawaiiensis* fajra jellemző eltérést azonosítottunk (7. ábra), míg a *B. spicifera* és *B. australiensis* fajok elkülönítésére alkalmas motívumot az általunk vizsgált DNS szakasz nem hordozott. Az egyetlen, a GenBank-ban fellelhető

humánpatogén *Cochliobolus* fajból származó JQ965129 kóddal ellátott *tef* szekvencia a leírás szerint *C. australiensis*ből származik. A 372 nukleotid hosszú szekvencia az általunk azonosított eltérések közül rövideje miatt csak az első kettőt tartalmazza. Az izolátum a két megadott pozícióban valóban nem a *B. hawaiiensis*re jellemző nukleotidokat hordoz, azonban az, hogy a *B. spicifera* vagy a *B. australiensis* fajhoz tartozik-e, a *tef* gén vizsgált szakaszának alacsony variabilitása miatt nem dönthető el.

TEF	262	327	541	693
<i>B. spicifera</i>	T	C	A	T
<i>B. australiensis</i>	A	C	A	T
<i>B. hawaiiensis</i>	A	T	G	C

7. ábra: A *tef* szekvenciák illesztése (1. sz. melléklet) során azonosított fajspecifikus eltérések a három *Bipolaris* referenciatörzsön szemlélítve.

Az rDNS ismétlődő egységeit elválasztó IGS régióról ismert, hogy mind hosszúság, mind szekvencia szempontjából nagyon változatos, ezért általában közeli rokon fajok, illetve faj alatti csoportok elkülönítésére alkalmas (Hillis és Dixon 1991). A 18S rDNS elejére tervezett invSR1R és a 28S rDNS végére tervezett LR12R indítószekvenciákkal felszaporítottuk az IGS régiót. A szekvenálás során az ampikonoknál is használt primerekkel az IGS régió elejéről izolátumtól függően 0,9-1,0 kb hosszúságú, az IGS régió végéről pedig 0,86-0,98 kb hosszúságú szakaszokat szekvenáltunk meg, melyeknek nem volt átfedő régiója. Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy az IGS régió esetében sikerült azonosítanunk a három vizsgált faj és a morfológiai alapon *Curvularia* jellegeket mutató csoport elkülönítésére alkalmas motívumokat.

A klinikusok által előzőleg csak *Bipolaris* sp.-ként azonosított keratomikózisból izolált törzsekből az LR12R indítószekvenciával kapott IGS1 szekvenciárészletben négyféle különböző specifikus motívumot azonosítottunk. Ezek külön-külön megfeleltethetők a *B. australiensis*, *B. hawaiiensis*, *B. spicifera* és a részletesebben nem vizsgált *Curvularia* nemzetségnek megfelelő motívumoknak (8. ábra).

A 8. ábrán látható motívumok közül a 1398-1404 és 1504-1517 nukleotidok közötti szakaszok a keratomikózisokból izolált minden faj elkülönítésére alkalmasak, mivel fajoként egyedi mintázatokat hordoznak. A táblázatban szereplő többi DNS szakasz közül az 1447-1457 nukleotidok közötti szekvenciárészlet a *B. hawaiiensis*, az 1459-1483 nukleotidok közötti szakaszok a *B. spicifera*, míg az 1519-1528 nukleotidok közötti régió a *B. australiensis* és a *Curvularia* fajokra specifikus nukleotid sorrendet hordoz.

IGS 1	1398-1404	1447-1457	1459-1483
<i>B. spicifera</i>	TTCTATT	-	TTTGAATGGCTGTCGTATAGTAAC
<i>B. australiensis</i>	TTTACTA (TTTTATA/ TTTGATA)	-	-
<i>B. hawaiiensis</i>	CTTTGA(T/C)	GTAGTAGTAGG	-

IGS 1	1504-1517	1519-1528
<i>B. spicifera</i>	C-TGACTGCAC---	AGCTAGTAAC
<i>B. australiensis</i>	-----T(G/T)CAGTAA	-----TAAT (--TTACTATT)
<i>B. hawaiiensis</i>	TGTAGCAGCAGTAG	AGCTAGTAAC

8. ábra: Az IGS1 szakasz fajspecifikus motívumai a referenciatorzseken szemlélítve. Zárójelben láthatók a más izolátumoknál adott pozícióban tapasztalt eltérések. Az ábrán feltüntetett szekvenciárészleteken kívül számos további motívum látható az **1. sz. melléklet**ben az 1528-2233 szakaszon is.

Az IGS régió előbbi szakaszához hasonlóan, a nagy alegység irányából felszaporított szekvenciárészlet (IGS2) is számos eltérő nukleotid mintázatot hordoz (**1. sz. melléklet**). Többségük egy-két nukleotid hosszúságú, melyek közül hét *B. australiensis*, míg öt a *B. hawaiiensis* specifikus (**9. ábra**). Az ábrán feltüntetetten kívül az 1.sz. mellékletben további, egyedül a *Curvularia* izolátumokat megkülönböztető specifikus mintázatok azonosíthatók.

IGS 2	2286	2294	2302	2353	2364	2376	2390-2392	2399	2439	2449	2479-2483
<i>B.spicifera</i>	A	G	G	T	C	T	CAA	T	G	C	ATCGG
<i>B. australiensis</i>	A	G	A	C	T	C	TAG	C	A	T	TTG(T)GG
<i>B. hawaiiensis</i>	G	A	G	T	C	T	CAA	T	G	C	ATCGA

IGS 2	2555	2566	2574	2617-2620	2626	2638	2642	2646-2648	2656-2657	2685
<i>B.spicifera</i>	G	C	A	TTCC	C	A	-	GGG	CT	C
<i>B. australiensis</i>	G	T	A	TTCA	T	T	A	TGA	TC	T
<i>B. hawaiiensis</i>	A	T	G	TCCA	C	A	-	GGG	TT	C

IGS 2	2688	2701	2717-2731	2734	2739	2751-2758	2764
<i>B.spicifera</i>	A	G	GATGTTGGGTGCCGC	-	C	AACAGCTG	T
<i>B. australiensis</i>	G	A	AATAATTAATACTAT	-	C	AATAA(G)TTT	C
<i>B. hawaiiensis</i>	A	G	GAGATTGGGTGCCGC	C	T	A(C)GCAGCTG	T

IGS 2	2765-2766	2780	2790	2796-2798	2803	2808	2830	2834	2841	2849
<i>B.spicifera</i>	AT	A	A	AAT	C	C	T	C	G	C
<i>B. australiensis</i>	TG	T	A	TAA	-	T	C	T	A	C
<i>B. hawaiiensis</i>	AT	A	G	GGT	C	C	T	C	A	T

IGS 2	2852	2916-2919	2936-2938	2946	3015-3031
<i>B.spicifera</i>	C	TCAAG	GAG	T	AACTCGTACGTCGACAA
<i>B. australiensis</i>	C	TCGA	TTG	C	AAGTCCCGGGAAAAA
<i>B. hawaiiensis</i>	T	TTAG	GAG	T	CCCGCGGACGTCGACAA

9. ábra: Az IGS2 szakasz fajspecifikus különbségei (**1. sz. melléklet**) a referenciatorzseken keresztül bemutatva. Zárójelben láthatók a más izolátumoknál adott pozícióban tapasztalt eltérések.

A *Bipolaris* nemzetségre koncentrálva, a több nukleotid hosszúságú mintázatok közül a 2390-2392 és 2936-2938 nukleotidok közötti régió egyedül a *B. australiensis* elkülönítéséhez hordoz elegendő információt, míg a 2479-2483, 2617-2620, 2656-2657, 2717-2731 és 2916-2919 nukleotidok közötti szekvenciárészletek esetén a *B. spicifera* és *B. hawaiiensis* fajokat elkülönítő apróbb különbségek is láthatók. Az IGS nagy alegység felőli részletének, a mindhárom *Bipolaris* fajt határozottan elkülönítő mintázatai a 2751-2758, 2796-2798 és 3015-3031 nukleotidok közötti szakaszokon találhatók.

A különböző DNS szekvenciák vizsgálata során az általunk azonosított molekuláris markererek segítségével a keratomikózisokból származó izolátumok többségét fajsztinon azonosítottuk, illetve megállapítottuk néhány nemzetközi adatbázisból származó törzs téves besorolását (**5. táblázat**).

5. táblázat: A törzsgyűjteményünkbe *Bipolaris* sp.-ként érkezett klinikai izolátumok fajspecifikus molekuláris markerekkel történő fajsztintú azonosítása, illetve a tévesen besorolt nemzetközi törzsgyűjteményből származó izolátumok valódi fajnevét bemutató összefoglaló táblázat.

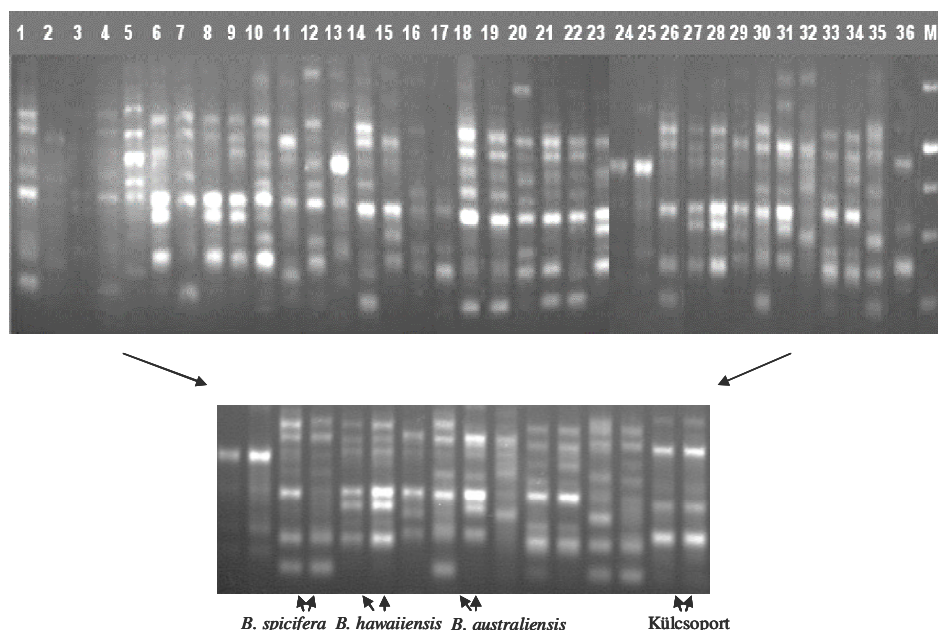
Törzsgyűjteményi szám	Eredeti név	Általunk azonosított fajnév
SZMC 13058	<i>Bipolaris</i> sp.	<i>Curvularia</i> sp.
SZMC 13075	<i>Bipolaris</i> sp.	<i>Bipolaris spicifera</i>
SZMC 13068	<i>Bipolaris</i> sp.	<i>Bipolaris spicifera</i>
SZMC 13062	<i>Bipolaris</i> sp.	<i>Curvularia</i> sp.
SZMC 13066	<i>Bipolaris</i> sp.	<i>Curvularia</i> sp.
SZMC 21168	<i>Bipolaris</i> sp.	<i>Curvularia</i> sp.
SZMC 13078	<i>Bipolaris</i> sp.	<i>Bipolaris spicifera</i>
SZMC 13079	<i>Bipolaris</i> sp.	<i>Bipolaris spicifera</i>
SZMC 13080	<i>Bipolaris</i> sp.	<i>Curvularia</i> sp.
SZMC 21169	<i>Bipolaris</i> sp.	<i>Curvularia</i> sp.
SZMC 13069	<i>Bipolaris</i> sp.	<i>Bipolaris hawaiiensis</i>
SZMC 13067	<i>Bipolaris</i> sp.	<i>Bipolaris hawaiiensis</i>
SZMC 13074	<i>Bipolaris</i> sp.	<i>Bipolarishawaiiensis</i>
SZMC 13059	<i>Bipolaris</i> sp.	<i>Curvularia</i> sp.
SZMC 13071	<i>Bipolaris</i> sp.	<i>Bipolaris spicifera</i>
SZMC 13060	<i>Bipolaris</i> sp.	<i>Bipolaris spicifera</i>
SZMC 13061	<i>Bipolaris</i> sp.	<i>Bipolaris hawaiiensis</i>
SZMC 13063	<i>Bipolaris</i> sp.	<i>Bipolaris hawaiiensis</i>
SZMC 13070	<i>Bipolaris</i> sp.	<i>Bipolaris hawaiiensis</i>
SZMC 13065	<i>Bipolaris</i> sp.	<i>Bipolaris hawaiiensis</i>
SZMC 13064	<i>Bipolaris</i> sp.	<i>Bipolaris spicifera</i>
SZMC 13073	<i>Bipolaris</i> sp.	<i>Bipolaris spicifera</i>
CBS 705.71 SZMC 13087	<i>Bipolaris australiensis</i>	<i>Bipolaris spicifera</i>
BRIP 28917a SZMC 13057	<i>Cochliobolus spicifera</i>	<i>Cochliobolus australiensis</i>

Összefoglalva eredményeinket elmondhatjuk, hogy az ITS régió, *cmd*, *tub* és *tef* szekvenciák nem hordoznak a *B. australiensis*, *B. hawaiiensis* és *B. spicifera* fajok elkülönítésére alkalmas motívumokat. Esetükben az IGS régiót javasoljuk a fajazonosításra, mely alkalmas mindhárom *Bipolaris* faj egyértelmű elkülönítésére az ábrakon és az 1. sz. mellékletben látható illesztésen jelölt fajspecifikus mintázatok alapján.

5.2.2. A random amplifikált DNS-polimorfizmus módszerének alkalmazása a klinikai *Cochliobolus* izolátumok azonosítására

Mivel munkánk során több gén esetén is alacsony variabilitást tapasztaltunk a random amplifikált DNS-polimorfizmus módszerét (RAPD) is teszteltük izolátumainkon (Levi és mtsi. 1993). Ezt a módszert gyakran használják növénypatogén *Bipolaris* fajok körében a különböző fajok intraspecifikus variabilitásának és a gazdanövény-gomba patogén kölcsönhatások tanulmányozására (Weikert-Oliveira és mtsi. 2002, Gomes Müller és mtsi. 2005, Mothlag és Anvari 2010). Az általunk tesztelt indítószekvenciák közül az OPG19, OPK16 és OPR15-el végzett polimeráz láncreakciók mindegyikében jól reprodukálható mintázatokot kaptunk. Ezek közül is az OPG19 segítségével kapott mintázat volt a legjobban jellemezhető. Izolátumtól függően több eltérő méretű amplikont kaptunk az 1500 bp és 250 bp közötti tartományban (**10. ábra**).

Összegezve a fajok azonosítására alkalmas markerek meghatározására irányuló vizsgálatok eredményeit, megállapítható, hogy a morfológiai vizsgálatok önmagukban nem elegendők az opportunistá humánpatogén *Bipolaris* izolátumok minden kétséget kizáró meghatározásához. A módszert szükséges kombinálni egy jól megválasztott DNS-szakasz elemzésével. Vizsgálataink megállapították, hogy a fajok közeli rokonsága miatt sem az ITS, sem a kalmodulin, *tub* és *tef* gének nem elég variábilisak a fajok elkülönítéséhez. A pontos fajmeghatározáshoz az IGS-régió szekvenciaelemzése ajánlott. Ehhez a fajokat reprezentáló referenciatorzseket jelöltünk ki, melyek segítségével meghatároztuk az IGS-régió fajazonosításra alkalmas szekvenciárészleteit. Ugyanakkor a *B. australiensis* és *B. spicifera* nagyfokú morfológiai hasonlóságát és szekvencia alapú közeli rokonságát látva, felvetődik az a kérdés, hogy esetükben beszélhetünk-e két ténylegesen elkülönülő fajról.



10. ábra: Az opportunista humánpatogén *Bipolaris* izolátumok RAPD-PCR reakciója során OPG19 indítószekvencia használatával létrejött mintázata. Az izolátumok sorrendje: 1-SZMC 13058; 2-SZMC 13059; 3-SZMC 13061; 4-SZMC 13060; 5-SZMC 13062; 6-SZMC 13063; 7-SZMC 13064; 8-SZMC 13083 *B. hawaiiensis*; 9-SZMC 13084 *B. hawaiiensis*; 10-SZMC 13065; 11-SZMC 13066; 12-SZMC 13067; 13-SZMC 21168; 14-SZMC 13068; 15-SZMC 13086 *B. australiensis*; 16-SZMC 13069; 17-SZMC 13070; 18-SZMC 13071; 19-SZMC 13073; 20-SZMC 13074; 21-SZMC 13081 *B. spicifera*; 22-SZMC 13075; 23-SZMC 13063; 24-SZMC 13080; 25-SZMC 21169; 26-SZMC 13081 *B. spicifera* 27-SZMC 13084 *B. hawaiiensis*; 28-SZMC 13085 *B. hawaiiensis*; 29-SZMC 13086 *B. australiensis*; 30-SZMC 13087 *B. australiensis*; 31-SZMC 13044 *C. australiensis*; 32-SZMC 13041 *C. australiensis*; 33-SZMC 13056 *C. hawaiiensis*; 34-SZMC 13042 *C. hawaiiensis*; 35-SZMC 13088 *B. spicifera*; 36-SZMC 13012 *B. sorokiniana*; M- 1 kb létra (Fermentas). A fajra jellemző sávmintázatok a kisebbik fotón láthatók.

5.3. A klinikai mintákból származó *Bipolaris* törzsek filogenetikai analízise

Elvégeztük a klinikai gyakorlatban is megjelenő *B. australiensis*, *B. hawaiiensis* és *B. spicifera* fajok rokonsági kapcsolatainak vizsgálatát több génen alapuló Bayes-féle analízissel.

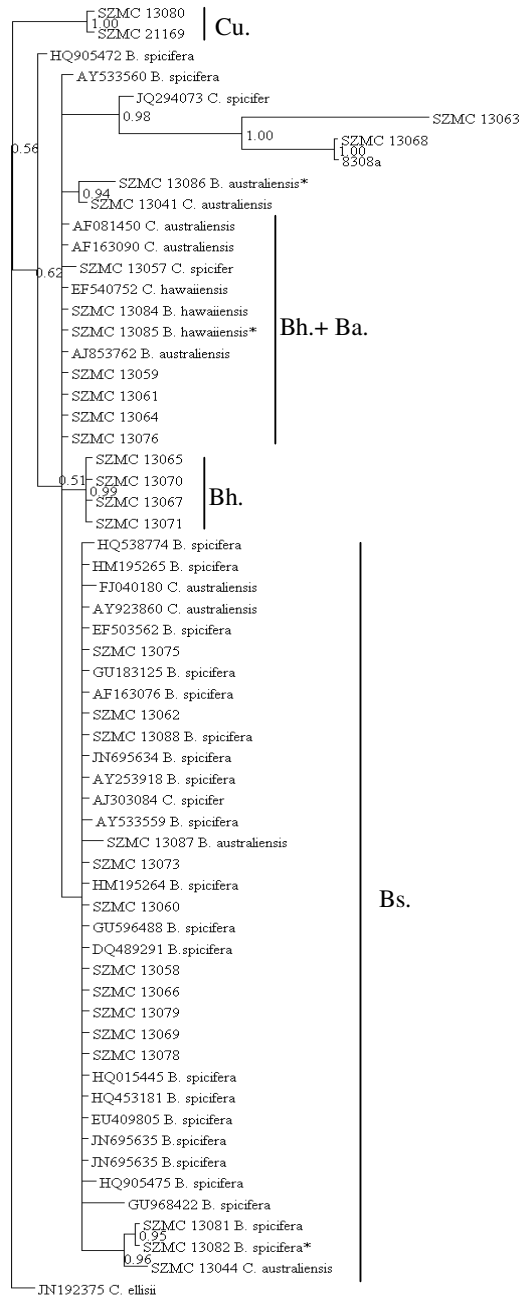
A filogenetikai elemzéseinkben először az ITS régiót vizsgáltuk, mivel az NCBI és EMBL nemzetközi adatbázisok a *B. australiensis*, *B. hawaiiensis*, *B. spicifera* és rokon fajokra vonatkozóan nagyszámú ITS szekvenciát tartalmaznak, továbbá egyre többször alkalmazzák a régió elemzését a fajazonosítás megerősítésére. Az általunk szekvenált törzsek közül a filogramokon egyedül SZMC számmal szereplők humán szaruhártyafekélyből, míg az SZMC számmal és fajnévvel is jelzett izolátumok törzsgyűjteményből származtak. A Bayes-féle analízisben használt illesztésbe a saját törzsgyűjteményünkben megtalálható izolátumok ITS régiója mellett, a GenBank adatbázisában megtalálható összes *B. australiensis*, *B.*

hawaiiensis és *B. spicifera* ITS szekvenciákat is bevontuk. Az adatainknak legjobban megfelelő Kimura két paraméter (K2P) modellt modellteszteléssel választottuk ki. Az elemzés eredményeként egy nagyon alacsony poszterior valószínűségekkel rendelkező, politómikus elágazásokat hordozó 50 % többségi konszenzus filogramot kaptunk (**11. A ábra**).

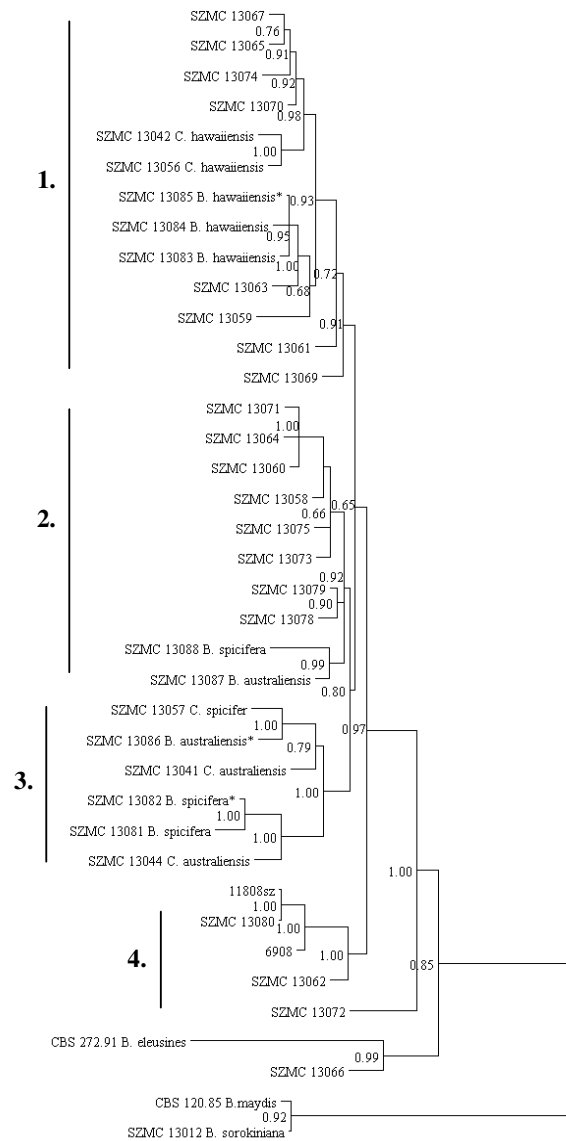
A filogramon egy korai leágazáson elválnak a *Curvularia* sp.-ként azonosított SZMC 13080 és SZMC 21169 izolátumok (**Cu. csoport, 11. A ábra**). A többi izolátum közül külön csoportot alkot a *B. spicifera* izolátumok többsége, melyek politómikus elágazások mentén helyezkednek el, továbbá az ITS régió kis varianciája miatt *B. hawaiiensis*, *Co. australiensis* és *Curvularia* törzsek is beékelődnek közéjük (**Bs. csoport, 11. A ábra**). Az elágazáson kívüli, politómikusan megjelenő *B. hawaiiensis* és *B. australiensis* törzsek mellett (**Bh.+Ba. csoport, 11. A ábra**) ugyanezen a szinten elkülönül egy *B. hawaiiensis* klinikai izolátumokból álló csoport (**Bh. csoport, 11. A ábra**) és egy *B. hawaiiensis* és *B. spicifera* törzseket vegyesen tartalmazó csoport is (**Bh.+ Bs. csoport, 11. A ábra**). Jobb felbontású filogram reményében a *tef* szekvenciákkal és a RAPD analízis gélelektroforetikus mintázatának bináris kódolású mátrixával is elvégeztük a Bayes-féle analízist. A *tef* szekvenciákhoz a GTR+G, míg a RAPD adatokhoz az egyparaméteres Markov modell illetett a legjobban. Az ITS régióval szemben, a *tef* szekvencia elemzéseit többségében a saját törzsgyűjteményi izolátumainkkal végeztük, mivel csak egy *B. spicifera* izolátum *tef* szekvencia található a GenBank adatbázisban. A RAPD adatok analízisének eredményeként az ITS régióval megegyező, alacsony támogatottságú, politómikus filogramot kaptunk, míg a *tef* szekvenciák esetén a változatlanul alacsony támogatottsági értékek mellett a politómia még mindig fennállt, de láthatóan csökkent (a RAPD és a *tef* adatok alapján készített törzsfákat nem tüntettük fel a dolgozatban).

A filogramok politómiájának és alacsony támogatottságának oka elsősorban a kevés differenciáló karakter. Ennek növelése érdekében a külön-külön végzett szekvenciaelemzéseket, az ITS régió, *tef*, *tub* és RAPD adatok kombinált illesztésével helyettesítettük. Az ebből kapott filogramon a támogatottsági értékek növekedtek, a politómia pedig jelentősen csökkent (**11. B ábra**). Kulcscsoportként a *B. sorokiniana* törzset alkalmaztuk.

Az izolátumok, két korai leágazáson elkülönülő *Curvularia* izolátumot leszámítva, négy jól körülhatárolt csoportot alkottak. Az ábrán szereplő 4. csoport a klinikai *Curvularia* törzsekből áll, míg a fennmaradó három csoportba a *Bipolaris* nemzetség tagjai találhatók. Az 1. csoportot a *B. hawaiiensis* izolátumok alkotják, a 2. csoportba elsősorban klinikai *B. spicifera* törzsek tartoznak, míg a 3. csoport a nemzetközi törzsgyűjteményekből származó *B. spicifera* és *B. australiensis* törzsek alkotta két alcsoportból áll.



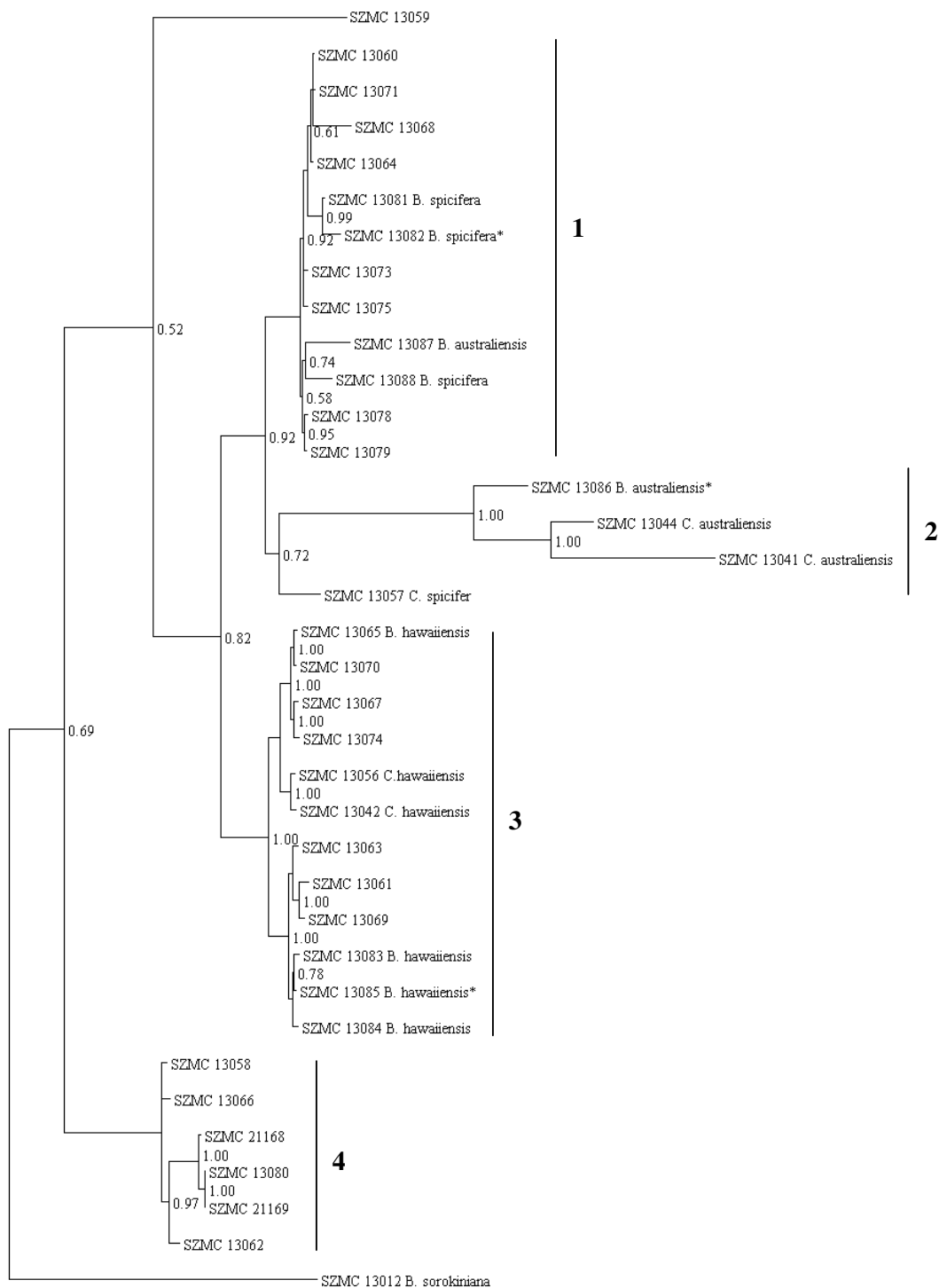
11. A ábra: Humán keratomikózisból, az SZMC törzsgyűjteményből és nemzetközi adatbázisból származó *Bipolaris* izolátumok ITS régiójának Bayes-féle analízisével készített 50 % többségi konszenzus filogramja. Saját törzsgyűjteményünk izolátumai SZMC, míg a nemzetközi adatbázisok törzsei saját kódjukkal és fajnevükkel szerepelnek az ábrán. A * jelöli a három faj típustörzseit. A Bayes-féle analízist a MrBayes 3.1.2 verziójával, 5×10^6 generáció és 2×10^4 burn-in értékek beállításával végeztük, kulcsoportként a *Curvularia ellisii* JN192375 törzset választottuk. A poszterior valószínűségi értékek $>0,95$ szignifikánsak.



11. B ábra: A törzsgyűjteményünk *Bipolaris* izolátumainak ITS régió + *tef* + *tub* + OPG19 RAPD-PCR amplifikációs mintázat bináris kódolású kombinált adatmátrixával (1920 nukleotid) végzett Bayes-féle analízis. A * jelöli a három faj típustörzseit. A Bayes-féle analízist a MrBayes 3.1.2 verziójával, 5×10^6 generáció és 2×10^4 burn-in értékek beállításával végeztük, kulcsoportként a *B. maydis* CBS 120.85 és *B. sorokiniana* SZMC 13012 izolátumokat használtuk. A poszterior valószínűségi értékek $>0,95$ szignifikánsak. Az ábrán 4 filogenetikai csoport különíthető el: 1- *B. hawaiiensis* izolátumok; 2- egy-egy *B. australiensis* és *B. spicifera* törzssel külön kládot alkotó klinikai izolátumok; 3- *B. australiensis* és *B. spicifera* izolátumok egy klád két külön végcsoportjaiban 4. további klinikai izolátumok.

Ez utóbbi, jó támogatottsággal rendelkező filogram esetén ismét felvetődött a kérdés, hogy a *B. australiensis* és *B. spicifera* esetében beszélhetünk-e valójában két különálló fajról. A kérdés közelebbi vizsgálata végett az előbbi kombinált filogramot kiegészítettük a számos fajspecifikus szekvenciamotívumot hordozó két IGS szakasszal is (az invSR1R primerrel szekvenált szakaszt IGS2-nek, míg az LR12R indítószekvenciával szekvenált szakaszt IGS1-nek neveztük el). A Bayes-féle analízist egy ITS régió + *tef* + *tub* + RAPD bináris mátrix + IGS1 + IGS2 szakaszok partícióiból álló illesztéssel végeztük (**2. sz. melléklet**), minden partícióhoz a megfelelő modellt kapcsolva. Az eredményül kapott 50 %-os többségi konszenzus filogramon négy filogenetikai csoport különböztethető meg. Ezek közül a legkorábban leágazó 4. csoport foglalja magába a *Curvularia* sp.-ként azonosított klinikai izolátumokat. A következő szinten a dichotómikus elágazás egyik ágát, a csak nemzeti szinten meghatározott *Bipolaris* sp. SZMC 13059 izolátum foglalja el, a másik ágon pedig a három vizsgált *Bipolaris* fajhoz tartozó izolátumok osztoznak. Közülük a jól körülhatárolt 3. csoportba a *B. hawaiiensis* izolátumok tartoznak, míg a másik ág a *B. spicifera* törzsek alkotta 1. csoport és a *B. australiensis* izolátumokból álló 2. csoport elágazásaiban végződik (**12. ábra**). A filogram korai elágazásai nem rendelkeznek magas támogatottsági értékekkel, az egyes kládok csomópontjai azonban szinte minden esetben elérik a szignifikáns értéket.

A filogenetikai elemzések alapján a *B. hawaiiensis* egy jól elkülöníthető faj a humánpatogén *Bipolaris*ok közt, melyet alátámasztanak mind a morfológiai, mind a molekuláris vizsgálatok eredményei. A *B. australiensis* és *B. spicifera* fajok esetében azonban a morfológiai és molekuláris vizsgálatok sem voltak meggyőzőek a két faj különbségét illetően. A *B. australiensis* fajszerű állapotával kapcsolatban további kétségeket vet fel az irodalmi adatok tüzetes átvizsgálása. Összesen hét esetleírás köthető a fajhoz, melyből hat kizárólag mikroszkópos vizsgálatokra alapozza a fajazonosítást (Chalet és mtsi. 1986, Flanagan és Bryceson 1997, del Palacio és mtsi. 1997, Newell és mtsi. 2006, Shamsi és Yasmin 2009), azt azonban már korábban bemutattuk, hogy morfológiai karakterek alapján nem különböztethetők meg a *B. spicifera* és *B. australiensis* fajok izolátumai. Emellett érdemes megemlíteni, hogy a fenti tanulmányok McGinnis és munkatársai (1986) munkájára hivatkozva azonosítják az izolátumaikat. Valóban ez a munka a legátfogóbb a humán kórokozó *Bipolaris* fajok körében, ugyanakkor a vizsgált 55 izolátumból csupán 3 volt *B. australiensis*. Ezek közül kettő a szerző által morfológiai alapon azonosított klinikai izolátum, míg egy a *Bromus unioloides*ről Alcorn (1978) által izolált törzs. Az egyik, molekuláris elemzést is használó tanulmányban az ITS régió kladisztikai elemzésére alapozva azonosították *B. australiensis*ként a vizsgált törzset (Dyer és mtsi. 2008).



12. ábra: Az opportunista humán patogénként is ismert *Cochliobolus* izolátumok ITS, *tub*, *tef*, illetve IGS szekvenciáit és a RAPD-PCR sávmintázatának bináris kódolását kombináló, 4460 nukleotid hosszúságú adatsorból Bayes-féle analízis segítségével készített 50 % többségi konszenzus filogram. A filogramon négy filogenetikai csoport különböztethető meg: 1- *B. spicifera*, 2- *B. australiensis*, 3- *B. hawaiiensis*, 4- *Curvularia* sp.. A poszterior valószínűségi értékek >0,95 szignifikánsnak.

Az ITS régióról ugyancsak bebizonyosodott eredményeink alapján, hogy nem alkalmas a humán kórokozó *Bipolaris* fajok elkülönítésére. Az, hogy Dyer munkájában *Co. australiensis* törzsekkel alkotott közös csoportot a vizsgált izolátum, elsősorban az elemzésbe bevont törzsek megválasztásának köszönhető, ugyanis a klinikai *Bipolaris* és rokon izolátumok közül csak *Co. australiensis* és *B. hawaiiensis* törzsek, illetve *Curvularia* szerepeltek a vizsgálatban. A másik tanulmány az USA klinikáin előforduló *Bipolaris* fajok diverzitását vizsgálta az ITS régió alapján a legnagyobb valószínűség elvével. A tanulmány szerint a 100 *Bipolaris* izolátumok közül egyértelműen elkülönültek a *B. hawaiiensis* izolátumok, míg a mindössze két *B. australiensis* izolátum közös elágazást alkotva vált el a *B. spicifera* törzsektől (da Cunha és mtsi. 2012).

A kérdés, hogy vajon beszélhetünk-e két különálló fajról a *B. australiensis* és *B. spicifera* esetében, vagy esetleg egy faj két változatáról lehet szó, továbbra is nyitott. A filogram *B. australiensis* csoportja esetén látható hosszú ághosszok utalhatnak a faj különállóságára, azonban a többi eredményt összességében vizsgálva mégsem lehet határozottan kijelenteni ezt. Mi azt feltételezzük, hogy a *B. australiensis* és *B. spicifera* valójában egy faj változatai. A kérdés megválaszolásához további vizsgálatokra van szükség több *B. australiensis*-ként meghatározott törzs bevonásával.

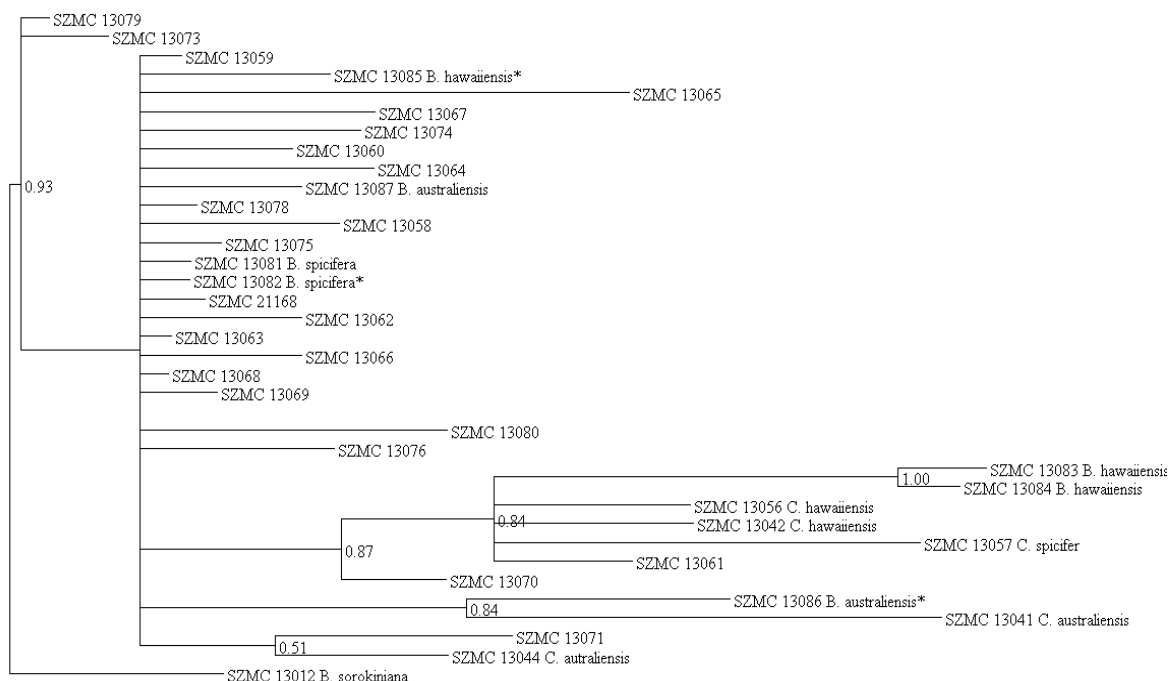
5.4. A humán kórokozó *Cochliobolus* izolátumok szénforrás-hasznosítási spektruma

Munkánk során meghatároztuk a fiziológiai szempontból kevésbé jellemzett humán keratomikózisokból izolált *Bipolaris* és *Curvularia* törzsek, illetve törzsgyűjteményi izolátumok szénforráshasznosítási spektrumát, melynek során szerettünk volna a *Bipolaris* fajok elkülönítésére alkalmas vegyületeket is azonosítani. A szénasszimilációs vizsgálatokba 6 *Curvularia* sp., 4 *B. australiensis*, 12 *B. hawaiiensis* és 13 *B. spicifera* izolátumot vontunk be.

A tesztelt vegyületek közül az összes izolátum a glükóz tartalmú táptalajon (pozitív kontroll) tapasztalt növekedéssel megegyező vagy azt megközelítő növekedést mutatott cellobióz, eritroz, etanol, D-fruktóz, laktóz, maltóz, melibióz, D-mannóz, piroszölősav, prolin, szacharóz, szerin, xilán és D-xilózt egyedi szénforrásként tartalmazó MM táptalajon. A cisz-akonitsav, orotsav és vanillin minden izolátum növekedését gátolta, míg a fenilalanin, ketoizovaleriánsav, l-metilmannozid, treonin, triptofán és α -metil-D-xilozid tartalmú táptalajokon csak a szénforrásmentes kontrollnak megfelelő nagyon gyenge háttérnövekedést tapasztaltunk. A lixózt és szorbózt leszámítva, a szénhidrát típusú vegyületeket általánosan jól hasznosították az izolátumok, míg az aminosavakat és szerves savakat gyengébben. A

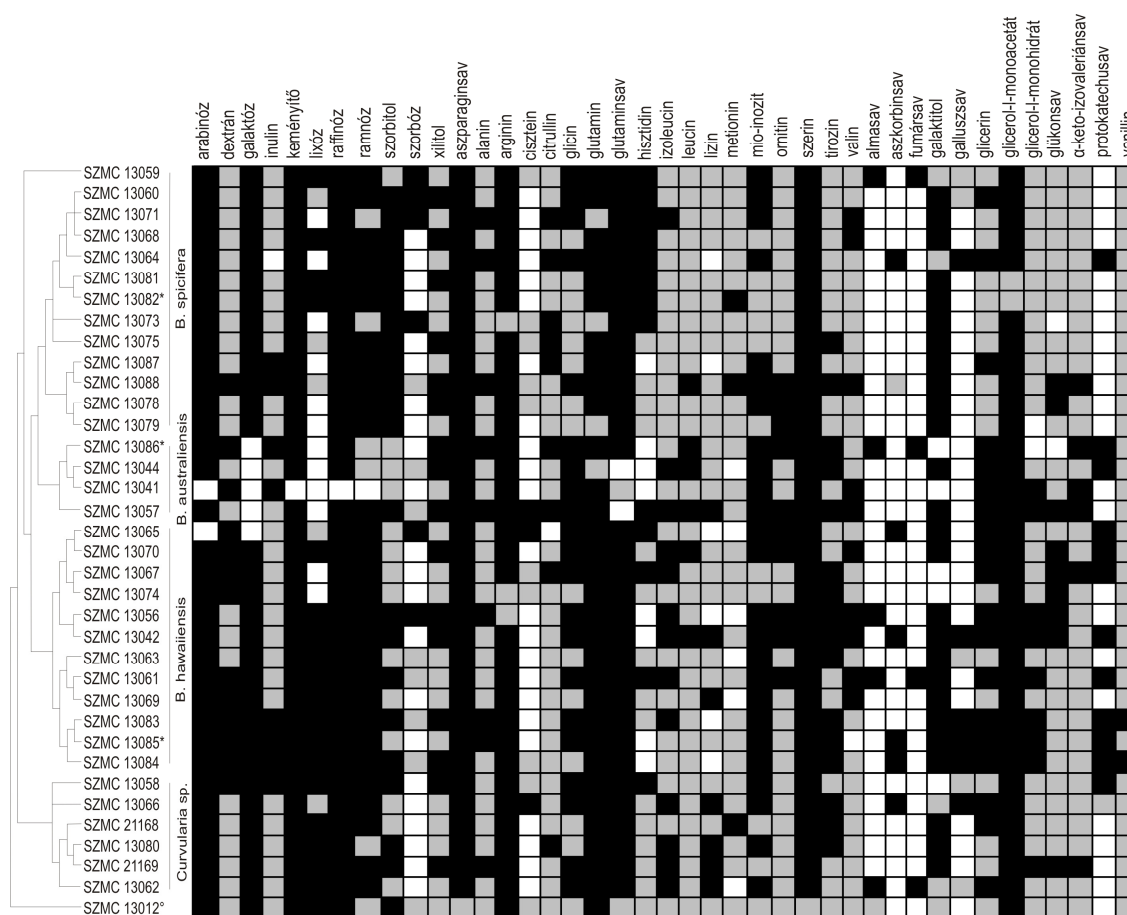
hasznosítási képesség adatait önmagában vizsgálva a nagy variabilitás miatt nehezen vonható le bármilyen következtetés.

A szénasszimilációs spektrumokat topológia készítéséhez is használható bináris formába kódoltuk. Eszerint 0-val jelöltük azokat a kölcsönhatásokat, melyek során gátolt, vagy a szénforrásmentes, MM táptalajon látható háttérnövekedésnek megfelelő növekedést tapasztaltunk. Amennyiben egy izolátum gyengén, de a háttérnövekedésnél szemmel láthatóan jobban növekedett, illetve megközelítette a glükózzal kiegészített táptalajon látható méretet, 1-el jelöltük. A bináris kódolású mátrixból egyparaméteres Markov modellel filogenetikai analízist végeztünk a MrBayes program segítségével (1×10^6 generáció, 5×10^3 burn-in értékek mellett), hogy megállapíthassuk az izolátumok szénforrás spektruma hordoz-e a fajazonosítás szempontjából hasznos információt (**13. ábra**). A filogenetikai fán is tükröződik, hogy a szénforráshasznosításban izolátum szintű különbségek láthatók, ugyanis az izolátumok többsége támogatottsági érték nélkül, politómikus elágazásokat alkotva egy nagy csoportot alkot. Egyedül a két *B. australiensis* alkot többé-kevésbé jól elhatárolható csoportot. A törzsfa alapján elmondható, hogy a szénasszimilációs spektrumok csak minimális filogenetikai információt hordoznak, tehát a spektrumok alapján nem lehet elkülöníteni a fajokat.



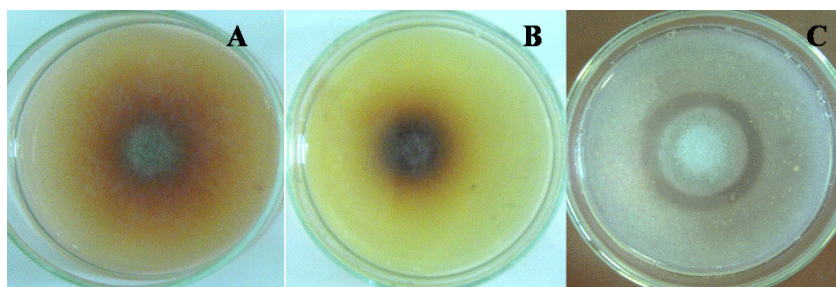
13. ábra: A *Bipolaris* és *Curvularia* izolátumok szénasszimilációs spektrumának bináris kódolású mátrixából készített filogram. A MrBayes analízist 1×10^6 generáció, burn-in 5×10^3 , K2P paraméter beállításokkal végeztük.

Az izolátumok valódi rokonsági viszonyait ábrázoló ITS + *tef* + *tub* + RAPD + IGS kombinált adatsorokból készített topológia tükrében is vizsgáltuk az izolátumok szénasszimilációs spektrumát. A törzsek által eltérően hasznosított vegyületek hasznosításának képességét színekkel jelöltük. A topológiát kombináltuk a szénforrás-hasznosítási képesség színekkel ábrájával, melyen szintén tükröződik, hogy a vizsgált *Cochliobolus*-ok izolátumtól függően nagyon eltérően hasznosították a vegyületeket, illetve a hasznosítási spektrumok nem hordoznak filogenetikailag hasznos információt (14. ábra).



14. ábra: A szénasszimilációs tesztekben eltérően hasznosított vegyületek, összevetve az ITS + *tef* + *tub* + RAPD bináris mátrix + IGS 1 és IGS 2 kombinált adatokból Bayes-féle analízis segítségével készített 50 % többségi koszenzus filogram topológiájával. ■ - szénforrásmentes kontrollnál láthatóan jobb növekedés: jól hasznosított szénforrás; ■ - a szénforrás nélküli kontrollnak megfelelő mértékű háttérnövekedés: a szénforrást nem képesek teljes mértékben hasznosítani, de nem is gátolja az anyagcsere-folyamataikat; □ - gátló vegyület, melyen látható növekedést nem mutatnak az izolátumok; * - az egyes fajokhoz tartozó típustörzsek; ° - külsőportként bevont *B. sorokiniana* CBS 110.14 törzs.

Egyes vegyületek alkalmazása érdekes fiziológiai változásokat okozott néhány izolátum esetén. A galluszsav és a protokatechusav öt *B. spicifera*, két *B. hawaiiensis* és három *Curvularia* izolátum. esetében hatással volt a másodlagos metabolit termelésre, mely a táptalajba kiválasztott többnyire barna, ritkán rózsaszín anyag megjelenésében nyilvánult meg (15. A, B ábra).



15. ábra: Az SZMC 13087 izolátum által képzett telepek a másodlagos anyagcseretermékek termelésére ható protokatechusavat (A) és galluszsavat (B) egyedi szénforrásként tartalmazó táptalajokon. Az SZMC 13082 izolátumnál látható oldási zóna tirozin tartalmú táptalajon (C).

Az SZMC 13082 izolátum esetében tirozin tartalmú táptalajon megfigyeltünk egy teljesen feltisztult zónát, mely a melanintermelésben elengedhetetlenül fontos tirozináz aktivitásra utal (15. C ábra). A kérdés valójában az, hogy a többi izolátum esetében miért nem láttunk hasonló oldási zónát, ugyanis a melanin jelenléte általánosan jellemző minden *Bipolaris* fajban.

A szénasszimilációs tesztek alkalmazása számos élesztő és baktérium azonosításában rutinszerű eljárás, fonalas gombák meghatározására és törzstipizálásra azonban csak ritkán használják (Vastag és mtsi. 1998, Barnett és mtsi. 2000, Schwarz és mtsi. 2007). Egyes esetekben mikrobiális közösségek szerkezetének és bioremediációs képességének vizsgálatára is alkalmazzák (Hagedorn és mtsi. 2003). Járomspórás gombák körében a szénforrás profilok alkalmasak a különböző *Mucor* és *Rhizopus* fajok (Schwarz és mtsi. 2007), illetve *Rhizomucor pusillus* és *Rhizomucor miehei* fajok (Vastag és mtsi. 1998) elkülönítésére. A *Cochliobolus* nemzetség anamorf alakjaira vonatkozó szénasszimilációs vizsgálatokról nem találtunk adatot. Egy tanulmány foglalkozott eddig a klinikai *Bipolaris* és *Exserohilum* izolátumok fiziológiai jellemzése alapján történő fajazonosítás lehetőségeivel. Pasarell és munkatársai (1990) *Bipolaris* és *Exserohilum* klinikai izolátumok exoantigén-lapú fajsztípus besorolását próbálták kidolgozni. A vizsgálatok során azonban az *E. rostratum* antiszérum az *E. mcginnisi*-vel, a *B. hawaiiensis* antiszérum a *B. australiensis* és *B. spicifera* antigénjével,

míg a *B. australiensis* és *B. spicifera* antiszériumok számos más *Bipolaris* és *Curvularia* faj antigénjével is keresztreakciót adtak. Exoantigén alapú módszerrel a *Bipolaris*ok és *Curvularia*ak csak nemzetség szintjén azonosíthatók (Pasarell és mtsi. 1990).

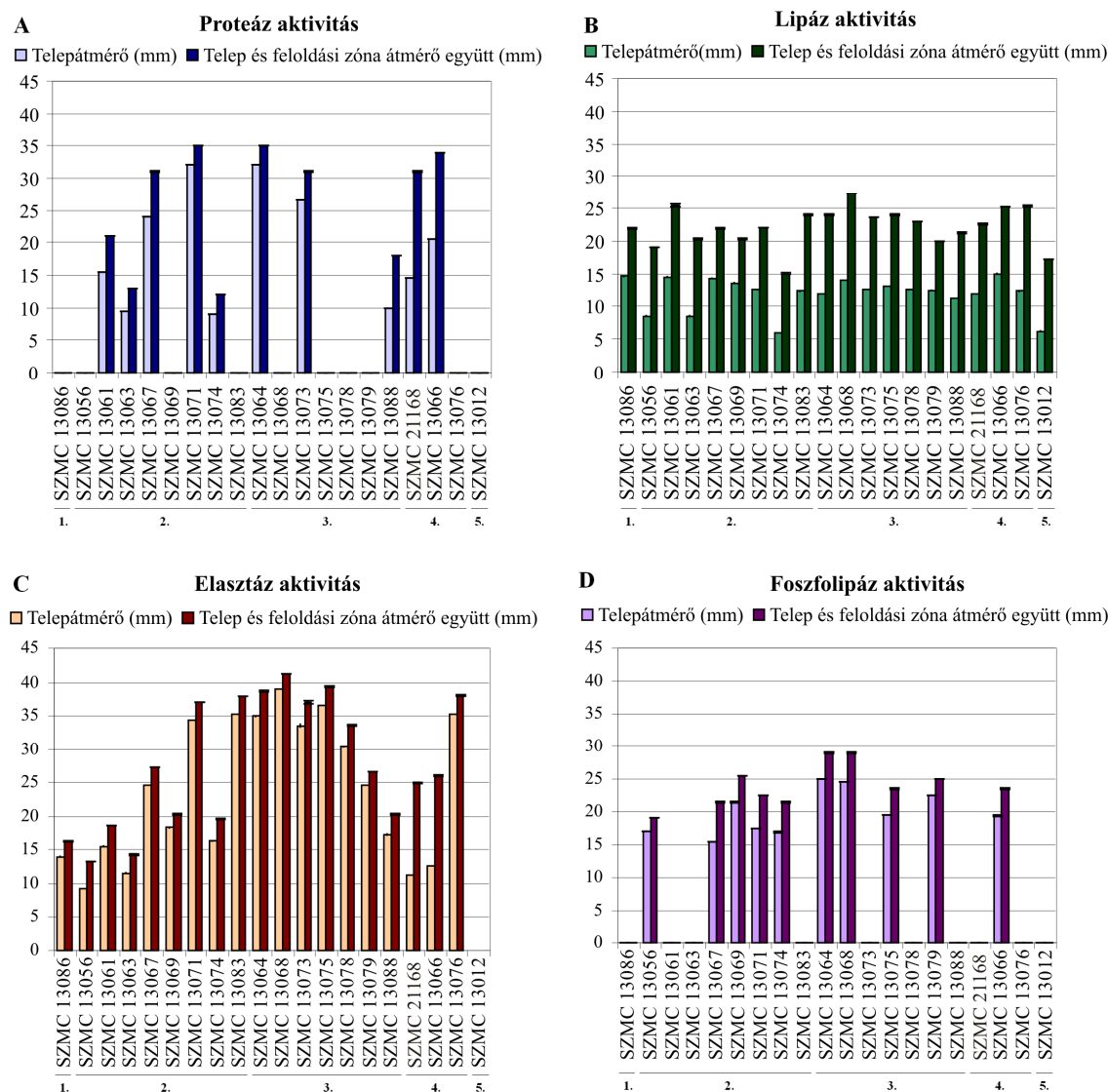
Eredményeinket összefoglalva elmondhatjuk, hogy a szénforráshasznosítási tesztek során meghatároztuk a rendelkezésünkre álló izolátumok szénasszimilációs spektrumát. A *B. australiensis*ek elkülönítésére feltételezhetően alkalmas a galaktóz, azonban a *Bipolaris* és *Curvularia* nemzetségek elkülönítésére alkalmas vegyületet nem sikerült azonosítanunk. A *Bipolaris*ok körében tapasztalt nagy intraspecifikus variabilitás és az interspecifikus variabilitás oka is a közeli rokonság lehet.

5.5. A humán kórokozó *Cochliobolus* izolátumok extracelluláris enzimtermelésének vizsgálata

Munkánk során teszteltük 8 *B. hawaiiensis*, 7 *B. spicifera*, 1 *B. australiensis* és 3 *Curvularia* izolátum. és egy növénykórokozó *B. sorokiniana* izolátum elasztáz, foszfolipáz, keratináz, lipáz és proteináz termelését. Minden tesztelt humán kórokozó izolátum rendelkezett lipáz és elasztáz aktivitással, azonban a foszfolipáz és proteáztermelés terén nagyon változatos képet kaptunk (**16. ábra**). A növénypatogén *B. sorokiniana* SZMC 13012 izolátumnál egyedül lipáz aktivitást tudtunk mérni, a többi vizsgált extracelluláris enzim termelését nem lehetett detektálni. Megjegyzendő, hogy amennyiben egy izolátum nem mutatja az adott enzim termelésének képességét, az jelentheti azt is, hogy az alkalmazott vizsgálati körülmények nem voltak megfelelően megválasztva (Souza és mtsi. 2008).

A borjú szérum albumin (*bovine serum albumin*, BSA) szubsztrátbontási képesség tesztelése során egy *B. hawaiiensis*, egy *B. spicifera* és két *Curvularia* izolátum bizonyult a legjobb proteáztermelőnek, míg tíz izolátum egyáltalán nem volt képes az enzim termelésére (**16. A ábra**). A proteáztermelés ugyan szerepet játszhat a fertőzés lefolyásában, termelése valószínűleg nem előfeltétele a gomba megtapadásának és szövetbe jutásának. Keratomikózisból izolált *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger* és *Fusarium* izolátumok proteináz termelésének vizsgálata során megállapították, hogy csak az izolátumok 56,5 %-a rendelkezett az enzim termelésének képességével (Nayak és mtsi. 2010), eszerint a szaruhártya szövetének roncsolásában más enzimek is szerepet játszanak. Továbbá a pigmentált humánpatogén és nem-patogén *Cladosporium*, *Exophiala*, *Fonsecaea*, *Lecythophora*, *Phaeoannelomyces*, *Phialophora*, *Wangiella* és *Xylohypha* izolátumok proteolitikus aktivitását vizsgáló tanulmányból kiderült, hogy a proteázok termelésében nem

különböznek a klinikai és környezeti izolátumok, így valószínűleg a betegségek kialakítása a pigmentált fonalas gombák esetében más tényezőkhez köthető (Espinell-Ingroff és mtsi. 1988). Ezzel szemben, a *Candida albicans* izolátumoknál egyes proteázok egyértelműen virulenciafaktorként szerepelnek a fertőzés kialakításában (Schaller és mtsi. 2008).



16. ábra: *Cochliobolus* izolátumok proteáz (A), lipáz (B), elasztáz (C) és foszfolipáz (D) termelési képességének vizsgálata. A számok az egyes fajokhoz tartozó izolátumok csoportját jelölik: 1.-*B. australiensis*; 2.-*B. hawaiiensis*; 3.- *B. spicifera*; 4.- *Curvularia* sp.; 5.-*B. sorokiniana*.

Az általunk vizsgált izolátumok mindegyike rendelkezett extracelluláris lipáztermelő képességgel. Az oldási zónák telepátmérőhöz viszonyított nagyságát figyelembe véve, adott

körülmények között jó lipáz termelőnek bizonyult minden vizsgált izolátum (**16. B ábra, 6. táblázat**). A növénypatogén törzs kimagaslóan jó lipáztermelő volt, míg az opportunistá patogén izolátumok közepesen jó enzimtermelőnek bizonyultak. Az enzim, a humán kórokozó gombákat tekintve, elsősorban a *Candida* fajok virulenciafaktor kutatásaiból ismert (Schaller és mtsi. 2005). Kimutatták, hogy a lipáz termelése elősegíti a *Malassezia furfur* hifaképzését és így a humán szövetben történő kolonizációt (Stehr és mtsi. 2003). Valószínűleg a *Bipolaris* izolátumok esetén is a szöveti kolonizációban lehet szerepe a lipáznak.

Elasztázt szintén termelt az összes *Bipolaris* és *Curvularia* törzs (**16. C ábra**), melyek közül a *B. hawaiiensis* SZMC 13056 izolátuma és az SZMC 21168 és SZMC 13066 *Curvularia* izolátumok voltak kiemelkedően jó enzimtermelők (**6. táblázat**). Az izolátumok elasztáztermelése a tüdő szöveti szerkezetének jelentős hányadát kitevő elasztin, továbbá az intersticiális extracelluláris mátrixot (kollagén III) és a bazális membránt (kollagén IV) alkotó kollagén bontása miatt nagyon jelentős. A bakteriális kór fertőzésekben szerepet játszó *Pseudomonas aeruginosa* esetén bizonyították, hogy az enzimtermelő izolátumok sokkal virulensebbek voltak, mint a nem termelő mutánsok, továbbá a kór elasztáz inhibitorral kezelve képes volt ellenállni a bakteriális fertőzésnek (Hoge és mtsi. 2010). *Bipolaris*ok terén nem találtunk adatokat elasztáztermelésre vonatkozóan, azonban a *Bipolaris* nemzetség tagjaihoz hasonló tüdőbetegségek kiváltásában jelentős *A. fumigatus* esetén számos tanulmány bizonyította, hogy az enzimnek szerepe van a gomba patogenitásában is (Kothary és mtsi. 1984, Tomee és Kaufmann 2000). Az *Aspergillus* izolátumok esetén is kimutatták, hogy az invazív aszpergillózisból származó törzsek jobb elasztáztermelők voltak, mint a nem-invazív fertőzésekből származó izolátumok (Rhodes 1995). Az elasztáztermelés tehát fontos faktor lehet a gombák okozta keratitiszek és az invazív tüdőmikózisok kialakulásában.

A foszfolipáztermelés vizsgálata során a proteázhoz hasonló, változatos eredményt kaptunk. Tíz izolátum esetében nem detektáltunk enzimaktivitást a Polak-féle tojássárgája tartalmú táptalajon (**16. D ábra**). A fennmaradó öt *B. hawaiiensis*, négy *B. spicifera* és egy *Curvularia* izolátum kisméretű oldási zónát hozott létre, így a Price-féle (Pz) index szerint nem bizonyult jó foszfolipáztermelőnek (**6. táblázat**). A Pz indexet a foszfolipáztermelés összehasonlíthatósága érdekében vezették be Price és munkatársai (1982). Az index kiszámolható a tenyészet átmérőjének és a tenyészet és a feltisztulási zóna együttes átmérőjének hányadosából. Ez a szám mindig az adott izolátumra jellemző enzimtermelési képességet mutatja. Minél alacsonyabb a Pz index, annál jobb enzimtermelő az adott izolátum. A foszfolipáz termelés méréséhez meghatároztak három tartományt, eszerint nem jó

enzimtermelő az adott izolátum, ha a Pz index 1-0,7 között van; közepesen jó termelő, ha a Pz index 0,699-0,4 közötti; és nagyon jó enzimtermelő, ha a Pz index 0,399-0,1 közötti értékeket vesz fel. A foszfolipáz szerepéről pigmentált gombák által okozott fertőzésekben nem sokat tudunk. A *C. albicans* és *Cryptococcus neoformans* patogenitásának vizsgálata során megállapították, hogy a foszfolipáz termelési képesség mindkét faj esetében fontos virulenciafaktor (Schaller és mtsi. 2005). Fonalas gombákra vonatkozóan, *A. fumigatus* esetében sikerült az enzim termelését az invazív fertőzések kialakításával kapcsolatba hozni (Alp és Arian 2008).

A keratináztermelést szintén vizsgáltuk munkánk során, azonban sem a tollat tartalmazó táptalajon, sem a keratinázúrt tartalmazó rázatott tenyészetekben nem tudtunk enzimaktivitást detektálni. Ez ellent mond azzal, hogy a dermatofitákon kívül számos más nemzetségben is azonosítottak keratinolitikus aktivitással rendelkező fajokat, így például a *Cochliobolus* nemzetséghez tartozó *Curvularia inaequalis*, továbbá az *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium* és *Penicillium* nemzetségek egyes képviselőit (Ali és mtsi. 2011, Saber és mtsi. 2010).

	Proteáz	Lipáz	Elasztáz	Foszfolipáz
SZMC 13086	-	0,663	0,858	-
SZMC 13056	-	0,455	0,699	0,913
SZMC 13061	0,735	0,568	0,839	-
SZMC 13063	0,73	0,427	0,812	-
SZMC 13067	0,773	0,611	0,901	0,782
SZMC 13069	-	0,668	0,901	0,76
SZMC 13071	0,91	0,56	0,936	0,776
SZMC 13074	0,625	0,442	0,831	0,75
SZMC 13083	-	0,56	0,929	-
SZMC 13064	0,914	0,5	0,905	0,862
SZMC 13068	-	0,512	0,943	0,8
SZMC 13073	0,85	0,52	0,901	-
SZMC 13075	-	0,542	0,932	0,976
SZMC 13078	-	0,548	0,9	-
SZMC 13079	-	0,625	0,924	0,916
SZMC 13088	0,55	0,53	0,838	-
SZMC 21168	0,46	0,522	0,454	-
SZMC 13066	0,602	0,591	0,585	0,833
SZMC 13076	-	0,499	0,938	-
SZMC 13012	-	0,367	-	-

6. táblázat: A *Cochliobolus* izolátumok extracelluláris proteáz-, lipáz-, elasztáz- és foszfolipáztermelő képességének bemutatása, a telepátmérő és a telepátmérő-oldási zóna hányadosa által számolt enzim termelési képességre utaló értékek összehasonlításával. Minél jobb enzimtermelő egy izolátum, annál kisebb a hozzá tartozó hányados. (-: nincs mérhető enzimaktivitás). Világosszürke háttér a jó (0,5-0,75), míg sötétszürke háttér (<0,5) a kimondottan jó enzimtermelő képességet jelzi.

Eredményeink szerint minden vizsgált, keratomikózisból származó *Bipolaris* izolátum jó lipáz és elasztáz termelő, míg proteáz és foszfolipáz termelésre csak néhány izolátum

képes. A fertőzések kialakítása szempontjából az elasztáznak lehetett kitüntetett szerepe, ám pontos következtetések levonásához további enzimaktivitás vizsgálatok elvégzése szükséges.

5.6. A *Cochliobolus* izolátumok gombaellenes szerekkel szembeni érzékenységének vizsgálata

A humán keratomikózisból származó *Cochliobolus* fajok gombaellenes szerekkel szembeni érzékenységének vizsgálata során meghatároztuk a poliének közül az AMB és a NAT, azolok közül a CLZ, ECO, FLU, ITR, KET, MCZ, valamint egy allilamin, a TRB, továbbá a sztatinkok közül az ATO, FLV, LOV, ROS és SIM vegyületek minimális gátló koncentrációit (MIC érték) a törzsgyűjteményünkben található izolátumokkal szemben. A MIC értéket minden hatóanyag esetén a 90%-os gátlásra vonatkozóan adtuk meg.

Az NCCLS M38-A2 nemzetközi szabványnak megfelelően végrehajtott mikrodilúciós tesztekben a vizsgált vegyületekre vonatkozó 90 %-os gátlást eredményező koncentráció értékeket (MIC₉₀) a 620 nm-en mért optikai denzitások alapján határoztuk meg. A mikózisos kezelésében „gold standard”-ként számon tartott, azaz szinte minden fertőzéssel szemben (kivéve *Fusarium* fajok) eredményesen használt AMB, esetünkben 0,25-4 µg/ml tartományban okozott 90 %-os növekedésgátlást. Az izolátumok többségénél 1 µg/ml koncentrációnál állapítottuk meg a MIC₉₀ értéket (7. táblázat). Viszonyításként megjegyezzük, hogy a szérumban elérhető legmagasabb AMB koncentráció 1-1,5 µg/ml körül van (Rex és mtsi. 2001). Az AMB-vel szembeni rezisztenciát, melyet 2 µg/ml feletti értéknél határoztak meg (Sutton és mtsi. 1999), az SZMC 13080 és 13082 izolátumok esetében figyeltük meg. Az AMB szérumban elérhető maximális koncentrációjánál alacsonyabb értékeket három *B. hawaiiensis*, négy *B. spicifera*, egy *B. australiensis* és két *Curvularia* izolátum esetében figyeltünk meg. A többségében magas gátlási koncentrációk, illetve a rezisztencia oka valószínűleg a gomba melanintermelésében keresendő. A szintén pigmentált *Cryptococcus neoformans* esetében már több tanulmány is bizonyította, hogy a melanizált törzsek AMB érzékenysége lényegesen alacsonyabb a melanin termelésére képtelen mutáns törzsekkel szemben (Jacobson 2000, Ikeda és mtsi. 2003). Feltételezhetően a melanin képes kötni az AMB-t, ezáltal akadályozza annak kötődését az ergoszterolhoz. A mi antifungális érzékenységi tesztünkkel megegyezően végzett kísérletek esetében is általánosságban 0,06-2 µg/ml koncentrációtartományban állapították meg az AMB *Bipolaris* és *Curvularia* izolátumokkal szembeni MIC értékeit (McGinnis és Pasarell 1998a, Espinel-Ingroff 2001, Espinel-Ingroff és mtsi. 2002, Ellis 2002). Azokban a tanulmányokban, melyekben egy faj

több izolátumát is vizsgálták, hozzánk hasonlóan jelentős mértékű intraspecifikus variabilitást figyeltek meg. Az AMB-hez képest a topikális kezelésekben *Fusarium* és *Aspergillus* fajok ellen is sikeresen alkalmazott NAT (Prajna és mtsi. 2003) egy-két hígítási lépéssel kisebb koncentrációknál eredményezett 90 %-os növekedésgátlást a vizsgált izolátumok esetében, mint az AMB (7. táblázat). A poliének esetében fajra jellemző érzékenységet nem tudunk azonosítani.

7. táblázat: A humán kórokozó *Cochliobolus* izolátumok polién, azol és allilamin típusú antifungális szerekkel szembeni érzékenysége. A vegyületek MIC értékét az NCCLS-M38-P módszer alapján határoztuk meg a tenyészetek optikai denzitásának 620 nm-en történő mérésével.

MIC ₉₀ értékek (µg/ml)										
Fajnév	SZMC szám	AMB	NAT	CLZ	ECO	FLU	ITR	KET	MCZ	TRB
<i>B. hawaiiensis</i>	13042	0,5	2	0,5	0,25	64	0,125	0,5	0,5	0,25
	13056	0,5	2	0,5	0,25	64	0,25	0,5	1	4
	13061	1	2	0,5	16	>64	0,25	0,25	0,25	4
	13063	0,125	2	2	2	32	0,125	0,5	2	2
	13065	1	2	1	2	64	1	1	1	2
	13067	0,5	2	1	1	32	1	1	1	1
	13069	0,5	2	0,5	4	64	0,25	1	1	2
	13070	1	4	1	4	32	0,125	1	1	4
	13074	0,5	2	1	>16	64	0,06	1	1	4
	13083	0,5	2	1	1	32	0,125	0,25	1	2
	13084	1	2	1	0,5	32	0,5	1	1	0,5
	13085	1	2	1	na.	32	0,125	1	0,5	2
<i>B. spicifera</i>	13060	0,5	1	1	>16	64	0,25	1	0,5	4
	13064	1	4	2	2	64	2	1	2	2
	13068	1	na.	2	16	64	2	2	4	na.
	13071	0,125	4	2	8	32	2	2	4	8
	13073	1	4	1	>16	32	0,25	1	4	2
	13075	0,25	na.	1	0,5	32	0,25	2	2	1
	13078	1	2	0,5	>16	64	1	1	1	2
	13079	1	2	0,5	2	64	4	2	4	2
	13081	0,5	2	0,125	na.	32	0,5	0,125	1	0,25
	13082	2	4	8	1	64	0,5	8	4	4
	13087	0,5	4	0,25	>16	64	0,5	2	2	0,5
	13088	1	2	8	16	64	1	4	4	na.
<i>B. australiensis</i>	13041	1	4	0,25	0,5	64	0,125	0,5	0,25	0,5
	13044	1	4	0,5	0,25	16	0,125	1	0,5	0,5
	13057	0,5	2	0,25	0,25	64	0,5	0,5	4	0,25
	13086	1	4	0,5	>16	32	0,5	0,5	0,5	na.
<i>Curvularia sp.</i>	13058	1	2	2	0,5	8	2	2	2	0,5
	13059	1	2	0,5	0,5	64	1	0,5	1	1
	13062	1	4	0,25	0,5	8	0,125	0,25	0,125	2
	13066	0,5	2	1	4	64	0,5	1	0,25	2
	13080	2	4	0,5	2	64	0,25	0,5	1	1
	21168	0,5	2	0,25	0,5	8	0,25	0,25	0,5	na.

na.-nincs adatunk a hatóanyag gátlására nézve az adott izolátummal szemben.

Az azolok körében található az izolátumainkkal szemben leghatékonyabb és a legkevésbé hatásos vegyület is. A leghatékonyabb az ITR volt, mely 0,06-4 µg/ml koncentrációtartományban érte el a 90 %-os gátlást (**7. táblázat**). Az izolátumok többségénél 0,5 µg/ml vagy annál alacsonyabb ITR koncentráció alkalmazásakor 90 %-os gátlást tapasztaltunk, amely megfelel a klinikai gyakorlatban a mikózisok sikeres kezelésére javasolt 0,25-0,5 µg/ml ITR plazmakoncentrációnak (Glasmacher és mtsi. 1999). A *Cochliobolus* törzsek közül az 1 µg/ml és azt meghaladó MIC₉₀ értéket három *B. hawaiiensis*, négy *B. spicifera* és egy *Curvularia* izolátum mutatta, melyek a Sutton (1999) tanulmányában 1 µg/ml-ben meghatározott ITR rezisztencia-érték szerint rezisztensnek tekinthetők a hatóanyagra. A *B. australiensis* izolátumok mindegyikénél 0,5 µg/ml vagy ez alatti ITR koncentrációnál már 90 %-os gátlást láttunk.

A FLU bizonyult a legkevésbé hatásosnak izolátumainkkal szemben, MIC értéke 4-64 µg/ml koncentrációtartományban volt (**7. táblázat**), de, a tesztelt törzsek nagy részénél 64 µg/ml vagy magasabb hatóanyag koncentráció volt szükséges a 90 %-os gátlás eléréséhez. Az érzékeny izolátumok esetén általában 32 µg/ml FLU gátolta a gombák növekedését. Itt is érdemes megjegyezni, hogy a 64 µg/ml feletti MIC₉₀ értékkel rendelkező törzseket – mely öt általunk vizsgált izolátumra jellemző – már flukonazol rezisztensnek tekintik (Ghannoum és Rice 1999, Sutton és mtsi. 1999).

Az 5 %-os NAT alternatívájaként alkalmazott ECO-t 2 %-os szuszpenzióként használják a szemfertőzések felületi kezelésére (Prajna és mtsi. 2003), azonban hosszútávú használata a szaruhártya irritációját okozhatja (Thomas 2003). Az általunk tesztelt izolátumokkal szemben nagyon szélsőséges, 0,25->16 µg/ml közötti koncentráció értékek eredményezték a gombák növekedésének gátlását (**7. táblázat**). Az ECO a tesztelt izolátumok majdnem felével szemben 16 µg/ml vagy azt meghaladó koncentrációnál gátolta teljesen a gombák növekedését. Ezen izolátumok szinte mindegyike a *B. spicifera* és *Curvularia* fajokhoz tartozik, három izolátumot leszámítva. A *B. hawaiiensis*ek többségével szemben az ECO MIC értéke 1-4 µg/ml koncentrációnál mérhető, csak két izolátumnál alacsonyabb (0,25 µg/ml), két izolátumnál azonban jóval magasabb (>16 µg/ml) ez az érték. A *B. australiensis* fajhoz tartozó törzsek közül háromnál már nagyon alacsony, 0,25 µg/ml koncentrációnál is 90 %-os gátlást idéz elő a hatóanyag, míg egy izolátumnál 16 µg/ml koncentrációnál sem éri el ugyanezt a hatást. Az irodalomban az ECO *in vitro* antifungális hatásának vizsgálatával foglalkozó tanulmányok többsége elsősorban élesztőkre koncentrált. A fonalas gombákra vonatkozó eredmények közül az ECO dermatofitákkal szemben már 0,1 µg/ml koncentrációban is hatásos (Venugopal és Venugopal 1995), míg eumicetómát okozó

pigmentált gombákkal szemben 2,5-5 µg/ml koncentrációban (Venugopal és mtsi. 1993), keratomikózist okozó *Aspergillus* izolátumok esetében 0,5-2 µg/ml koncentrációban alkalmazva okoz 90 %-os gátlást (Kredics és mtsi. 2009, Manikandan és mtsi. 2009).

A további imidazolok közül, a CLZ 0,125-8 µg/ml, a KET 0,125-16 µg/ml, míg a MCZ 0,125-8 µg/ml koncentrációtartományban hatásos, ám az izolátumok többségét már 0,5-1 µg/ml körüli koncentrációban gátolja mindhárom (7. táblázat). A CLZ felületi kezelésekben alkalmazott vegyület, melynek használata elsősorban *Aspergillus* által okozott keratitisz kezelésére ajánlott, ám hosszútávú alkalmazás esetén, az ECO-hoz hasonlóan, károsíthatja a szaruhártyát (Thomas 2003). A *B. spicifera* izolátumok között található a két, CLZ-vel szemben legkevésbé érzékeny izolátum (MIC₉₀: 8 µg/ml), de a legérzékenyebb izolátum is (MIC₉₀: 0,125 µg/ml). A CLZ a *B. australiensis* izolátumok mindegyikét már 0,125-0,5 µg/ml koncentrációban gátolja. A KET esetén is hasonló variabilitás látható, ez esetben is a *B. spicifera* csoportba tartoznak a kevésbé érzékeny izolátumok (7. táblázat). A KET elsősorban *Aspergillus* és *Curvularia* törzsek által okozott szemfertőzések kezelésében hatásos mind felületi, mind orálisan formában alkalmazva (Guarro és mtsi. 1999, Thomas 2003). A MCZ esetében jól látható különbség van a fajok antifungális érzékenységeiben. A *B. hawaiiensis* izolátumok esetén a MCZ MIC értéke 0,25-2 µg/ml (a többségét már 1 µg/ml) koncentrációtartományban található, ezzel szemben a *B. spicifera* izolátumok esetén ugyanez a hatás csak magasabb koncentrációk (0,5-4 µg/ml) alkalmazásával az esetek többségében 4 µg/ml-vel érhető el. A *B. australiensis* és a *Curvularia* izolátumok MIC értékei a 0,25-4 µg/ml koncentrációtartományban találhatók.

A TRB elsősorban dermatofiták kezelésében alkalmazott hatóanyag, mely már nagyon alacsony, 0,007-0,031 µg/ml koncentrációban gátolja egyes fajok növekedését *in vitro* kísérletek során (da Silva Barros 2009). Az általunk vizsgált izolátumok esetében ennél lényegesen nagyobb, 0,25-8 µg/ml koncentráció tartományban okozott 90 %-osnál nagyobb mértékű növekedésgátlást (7. táblázat). A *B. australiensis* izolátumok voltak legérzékenyebbek a TRB-nal szemben, mely MIC értéke a 0,25-0,5 µg/ml koncentrációtartományban volt, míg a többi fajnál izolátumonként nagyon változó koncentráció-értékek mellett láttuk ugyanezt a hatást.

A sztatínok antifungális hatásának *Cochliobolus*okkal szembeni vizsgálata során a fluvasztatin (FLV), lovasztatin (LOV) és szimvasztatin (SIM) bizonyultak a leghatékonyabbnak, míg az atorvasztatin (ATO) és rozuvasztatin (ROS) a vizsgált koncentrációtartományokban csak néhány izolátum növekedését tudta hatékonyan gátolni. Az FLV a fajok csaknem felével szemben 3,125 µg/ml, míg kisebb hányaduknál már 1,5625

µg/ml koncentrációnál gátolt (**8. táblázat**). Ezeknél alacsonyabb érték csak öt *B. hawaiiensis* izolátumnál fordult elő, ahol már 0,78 µg/ml koncentrációjú FLV előidézte a 90 %-os gátlást. Az átlagos MIC értékeknél magasabb értékeket négy *B. spicifera* törzsnél figyeltünk meg, ahol a legalacsonyabb 90 %-os gátlást okozó koncentráció is meghaladta a plazmában maximálisan elérhető FLV koncentráció 0,448 µg/ml-ben meghatározott értékét (Galgóczy és mtsi. 2009). A *Cochliobolus*ok esetén mért MIC₉₀ értékek megegyeznek, esetenként alacsonyabbak az *Aspergillus* és különböző *Zygomycetes* izolátumok körében mért MIC értékeknél (2->128 µg/ml) (Nyilasi és mtsi. 2010, Galgóczy és mtsi. 2011).

8. táblázat: *Cochliobolus* izolátumok sztatinnokkal szemben mutatott érzékenysége.

Fajnév	SZMC szám	MIC ₉₀ értékei (µg/ml)				
		ATO	FLV	LOV	ROS	SIM
<i>B. hawaiiensis</i>	13042	6,25	0,78	3,125	12,5	0,39
	13056	25	6,25	6,25	25	6,25
	13061	25	3,125	6,25	25	6,25
	13063	25	3,125	25	12,5	6,25
	13065	25	1,5625	12,5	25	6,25
	13067	25	3,125	6,25	25	0,78
	13069	12,5	0,78	6,25	6,25	0,39
	13070	>25	0,78	6,25	>25	3,125
	13074	25	0,78	6,25	25	6,25
	13083	25	3,125	12,5	25	6,25
	13084	25	0,78	3,125	>25	6,25
	13085	12,5	1,5625	6,25	25	0,39
<i>B. spicifera</i>	13060	25	3,125	12,5	12,5	3,125
	13064	25	1,5625	6,25	25	3,125
	13068	25	1,5625	6,25	25	3,125
	13071	25	3,125	25	25	25
	13073	25	12,5	6,25	12,5	1,5625
	13075	25	3,125	25	25	25
	13078	25	3,125	12,5	25	12,5
	13079	>25	12,5	25	>25	25
	13081	12,5	1,5625	3,125	25	0,78
	13082	>25	12,5	25	>25	12,5
	13087	25	6,25	25	25	25
	13088	>25	3,125	25	25	25
<i>B. australiensis</i>	13041	25	1,5625	12,5	25	0,78
	13044	25	0,79	12,5	25	3,125
	13057	6,25	3,125	12,5	25	0,39
	13086	25	3,125	12,5	25	3,125
<i>Curvularia sp.</i>	13058	25	3,125	12,5	25	6,25
	13059	>25	1,5625	25	>25	25
	13062	>25	3,125	6,25	>25	1,5625
	13066	12,5	12,5	3,125	12,5	12,5
	13080	25	1,5625	12,5	25	6,25
	21168	6,25	3,125	3,125	12,5	0,78

A SIM az izolátumok majdnem negyedénél már 0,39 µg/ml koncentrációban, negyedénél 0,78 µg/ml, mígharmadánál 1,5625 µg/ml koncentrációban okozott 90 %-os gátlást. A SIM MIC értékei *Cochliobolus* törzsek esetén lényegesen alacsonyabbak, mint a járomspórás gombákkal és *Aspergillus* izolátumokkal végzett kísérletekben tapasztalt 4->128 µg/ml koncentrációk (Nyilasi és mtsi. 2010, Galgóczy és mtsi. 2011), A plazmában maximálisan elérhető 0,01-0,034 µg/ml-es értékeknél (Galgóczy és mtsi. 2009) még így is több hígítási lépéssel magasabbak ezek az értékek. A LOV az előző két sztatinnál valamivel gyengébb antifungális hatású, csak 3,125->25 µg/ml koncentrációtartományban okozta az izolátumok növekedésének gátlását (**8. táblázat**). Az irodalmi áttekintésben ismertetett, LOV-al végzett antifungális tesztekben a járomspórás gombák körében 128 µg/ml, aszkuszos gombák esetén 25->128 µg/ml koncentrációtartományban határozták meg a hatóanyag MIC értékeit izolátumtól függően (Chamilos és mtsi. 2006, Nyilasi és mtsi. 2010, Galgóczy és mtsi. 2011). A LOV *Bipolaris* és *Curvularia* izolátumokkal szemben meghatározott MIC₉₀ értékei szintén jelentősen meghaladják a plazmában elérhető 0,01-0,02 µg/ml koncentráció értékeket (Galgóczy és mtsi. 2009).

A ROS és ATO antifungális hatása gyengébb volt izolátumainkkal szemben, mint a FLV-é és a természetes sztatinnal vegyületeké. Mindkét vegyület 6,25->25 µg/ml koncentráció tartományban gátolja a gombák növekedését izolátumtól függően, a törzsek döntő többségénél (több mint háromnegyedük) azonban mindkét vegyület csak 25 µg/ml vagy afölötti koncentrációban alkalmazva képes gátolni az izolátumokat (**8. táblázat**). A plazmában elérhető maximális ATO és ROS koncentrációk az előzőekhez hasonlóan több hígítási lépéssel alacsonyabb koncentráció értékekben vannak meghatározva, ATO esetén 0,027-0,066 µg/ml, míg ROS esetén 0,033 µg/ml (Galgóczy és mtsi. 2009).

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy a keratomikózisok kezelésében általánosan alkalmazott AMB az izolátumok többségénél csak nagyon magas, a plazmában maximálisan elérhető AMB koncentráció mellett gátolta a törzsek növekedését. A FLU-lal szemben néhány törzs rezisztensnek bizonyult, de az izolátumok többségénél ugyancsak magas dózisban, a rezisztenciát megközelítő koncentrációban okozott gátlást. Az ITR, egyes izolátumok esetén a CLZ és KET voltak a leghatékonyabbak a ma használt antifungális vegyületek közül. A sztatinnal közül a FLV és SIM volt a leghatékonyabb, ám ezek is a plazmában maximálisan elérhető hatóanyag koncentrációt meghaladó értékben alkalmazva voltak csak hatásosak a tesztelt *Bipolaris* és *Curvularia* izolátumokkal szemben.

5.7. Antifungális hatású vegyületek kombinációinak vizsgálata *Cochliobolus* izolátumokkal szemben

Hatóanyag kombinációs tesztjeinket a checkerboard titrálás módszerének megfelelően végeztük el a sztatínokat (ATO, FLV, LOV, ROS és SIM) egyenként kombinálva az antifungális vegyületekkel (AMB, FLU, ITR, KET és MCZ) 2 *B. hawaiiensis* (SZMC 13063, 13083) és négy *B. spicifera* (SZMC 13071, 13075, 13087, 13088) izolátummal szemben. A célunk az volt, hogy hatékony drog kombinációkat találjunk, melyek együttesen alkalmazva nagyobb növekedésgátlást fejtenek ki illetve együttesen kisebb koncentrációban alkalmazhatóak. A hatóanyagok közötti kölcsönhatás típusának meghatározását mindkét használatban lévő módszer, azaz a FIC index (Hall és mtsi. 1983) és az Abbott-formula (Gisi 1996) segítségével is elvégeztük.

Minden tesztelt hatóanyag kombináció esetén pozitív vagy indifferens kölcsönhatást tapasztaltunk, antagonista kölcsönhatás egyetlen esetben sem fordult elő. A tesztelt izolátumokkal szemben 90 %-os gátlást elérő hatóanyag kombinációk és a kölcsönhatások típusa a **9. A, B és C táblázatokban** láthatók. Additív kölcsönhatással talákoztunk túlnyomórészt, továbbá sok olyan esettel, amikor az egyik számolási módszer alapján már szinergizmust jelez, miközben a másik formula alapján még additív hatású az adott hatóanyag kombináció. Ezek az eltérések a két formula számolási módszerének különbözőségéből fakadnak. Az Abbott-formula az izolátum aktuális optikai denzitásából kalkulál, a hatóanyagra jellemző gátlási értékeket veszi figyelembe, míg a FIC index a rögzített számértékű MIC₉₀ értékekkel számol.

Az AMB-sztatin kombinációkban a MIC₉₀ érték eléréséhez szükséges AMB koncentráció a *B. hawaiiensis* izolátumok esetén egy hígítási lépéssel csökkent már a legkisebb koncentrációjú sztatin hozzáadása esetén is. Az AMB-FLV kombinációk esetén mindkét vegyület önmagában is jól gátolta az izolátumokat, így együttesen sem váltottak a gátláshoz szükséges koncentrációk, hatásuk indifferens. Az AMB-ATO, AMB-ROS, AMB-SIM és AMB-LOV kombinációk mindkét formulával számolva a szinergista és additív kölcsönhatás határán vannak a *B. hawaiiensis* izolátumok esetén (**9. A táblázat**). A *B. spicifera* izolátumokra is jellemző, hogy az AMB-FLV hatóanyagok közt nincs jelentős kölcsönhatás, kombinációban egy hígítási lépéssel csökken a hatóanyagok MIC értéke az önmagukban mért értékekhez képest. Az SZMC 13075 és 13088 izolátumoknál az AMB-ATO és AMB-LOV, míg az SZMC 13087 törzsnél az előbbi kombinációk mellett az AMB-ROS és AMB-SIM kombinációkban a hatóanyagok kölcsönhatásának számértékben kifejezett

értéke megközelíti a szinergizmust (**9. B, C táblázat**). Hasonló hatást tapasztaltak AMB-sztatin kölcsönhatásokat vizsgálva *Rhizopus* és *Aspergillus* törzsek esetén (Galgóczy és mtsi. 2010, Nyilasi és mtsi. 2010).

A *B. hawaiiensis* izolátumokkal szemben az FLU-sztatin kombinációk bizonyultak a leghatásosabbnak. Az SZMC 13063 esetén az Abbott-formulát és FIC-indexet tekintve a FLU minden sztatin vegyülettel szinergista kölcsönhatást alakított ki (**9. A táblázat**). A mindkét formula által támogatott, egyértelmű szinergista kölcsönhatásokat egyedül a FLU és FLV, KET vegyületek együttes alkalmazásánál tapasztaltunk. Az FLU-FLV és FLU-LOV szinergista kölcsönhatást *C. albicans*, *C. glabrata* és *A. fumigatus* fajok vizsgálata során is megfigyelték korábban (Chin és mtsi. 1997, Song és mtsi. 2003, Nyilasi és mtsi. 2010). A *B. hawaiiensis* SZMC 13083 törzs esetén FLU-ATO, FLU-FLV és FLU-ROS kombinációk esetén tapasztaltunk az egyik formula által támogatott szinergizmust, de a mindkét számítás alapján additív kölcsönhatást mutató FLU-LOV és FLU-SIM kombinációkban is több lépéssel csökkent a sztatinok MIC értéke. Ezzel szemben a FLU-sztatin kombinációk *B. spicifera* izolátumokkal szemben nem erősítették, de nem is gyengítették egymás hatását. A FLU és FLV vegyületek közt indifferens hatás volt az SZMC 13075 izolátumnál, azonban ezen kívül minden esetben additív kapcsolatba léptek egymással, továbbá az SZMC 13075 törzsnél a FLU-SIM, míg az SZMC 13087 törzsnél a FLU-LOV alakított ki hasonló kölcsönhatást (**9. B, C táblázat**).

Az ITR-sztatin kombinációk esetén minden izolátumnál jellemzően additív kölcsönhatást tapasztaltunk a vegyületek között, azonban a sztatinok kombinációban mért 90 %-os gátlás eléréséhez szükséges koncentrációja nem csökkent olyan jelentős mértékben az önmagában kiváltott MIC értékhez képest, mint az az előzőleg ismertetett azolok esetében látható. Szinergizmust megközelítő érték a *B. hawaiiensis* SZMC 13063 izolátum esetén az ITR-LOV és ITR-SIM, az SZMC 13083-nál az ITR-ROS és ITR-SIM kombinációknál látható (**9. A táblázat**), míg ugyanez a *B. spicifera* SZMC 13071 törzsnél az ITR-SIM (**9. B táblázat**), a 13087 izolátum esetén az ITR-ATO, ITR-LOV és ITR-SIM kombinációknál figyelhető meg (**9. C táblázat**). Korábbi, élesztőkkel végzett kísérletek során az ITR-sztatin kombinációkban mindegyik vegyület MIC értéke jelentősen csökkent az önmagukban kiváltott MIC értékhez képest, de túlnyomó többségében ezek is additív kölcsönhatásokat jelentettek (Nyilasi és mtsi. 2010). ITR-t sztatinokkal kombinálva *Aspergillus*, *Rhizopus* és *Paecilomyces* izolátumok esetén is többségében additív kölcsönhatások mértek. Csupán két izolátumnál detektáltak szinergizmust az ITR-SIM és ITR-ROS kombinációk alkalmazásakor (Nyilasi és mtsi. 2010).

9. A táblázat: A MIC₉₀ értéket elérő ATO, FLV, LOV, ROS, SIM és AMB, FLU, ITR, KET, MCZ kombinációk, illetve a kölcsönhatások típusa *B. hawaiiensis* SZMC 13063 és SZMC 13083 izolátumok esetében.

	AMB	FLU	ITR	KET	MCZ
<i>B.hawaiiensis</i> SZMC 13063					
ATO /12,5-25	/0,13 0,06+0,38 (A; 1,16; 0,52)	/32 4+12,5 (A; 0,91; 0,625) 8+6,25 (SZ; 3,96; 0,5) 16+0,78 (A; 0,93; 0,53)	/0,13 0,13+3,13 (A; 0,92; 0,75)	/0,5 0,03+12,5 (A; 1,35; 0,56) 0,13+6,25 (SZ; 3; 0,5) 0,25+0,39 (A; 1,13; 0,52)	/2 -
FLV /1,56-3,13	-	1+1,56 (A; 1,25; 0,53) 4+0,78 (SZ; 3,13; 0,38) 8+0,39 (SZ; 2,1; 0,38)	<u>0,03+0,39 (SZ-A; 1,38; 0,49)</u>	<u>0,25+0,39 (SZ-A; 1,9; 0,75)</u>	-
LOV /12,5-25	0,13+0,38 (A; 1,4; 0,53)	2+12,5 (SZ-A; 1,86; 0,56) 8+6,25 (SZ; 2,23; 0,5) 16+0,78 (A; 0,85; 0,53)	0,03+6,25 (A; 0,76; 0,74) 0,06+12,5 (A; 0,97; 0,73)	0,06+12,5 (A; 1,33; 0,62)	-
ROS /12,5	0,06+0,38 (A; 0,95; 0,52)	8+3,13 (SZ; 2,77; 0,5) 16+0,78 (A; 1,11; 0,56)	<u>0,03+6,25 (SZ-A; 1,82; 0,62)</u> 0,13+1,56 (A; 1,2; 0,63)	<u>0,25+6,25 (SZ-A; 2,49; 0,75)</u>	-
SIM /6,25	0,06+0,38 (A; 1,4; 0,52)	8+3,13 (SZ-A; 2,07; 0,75) 16+0,39 (A; 0,89; 0,56)	0,03+3,25 (A; 1,29; 0,76) 0,06+0,39 (A; 1,09; 0,54)	<u>0,03+6,25 (SZ-A; 2,56; 0,74)</u> 0,25+3,13 (A; 1,03; 1)	-
SZMC 13083					
ATO /25	/0,5 0,25+0,39 (A; 1,5; 0,51)	/32 8+12,5 (A; 0,95; 0,75) <u>16+3,13 (SZ-A; 1,62; 0,62)</u>	/0,06-0,13 0,03+12,5 (A; 0,76; 0,74)	/0,25-0,5 0,125+25 (A; 0,95; 0,75)	/1 -
FLV /1,56-3,13	-	4+1,56 (A; 0,81; 0,63) <u>8+0,39 (SZ-A; 1,07; 0,37)</u>	0,03+0,39 (A; 0,84; 0,75)	0,25+0,39 (A; 1,18; 0,75)	-
LOV /12,5-25	0,25+0,39 (A; 1,5; 0,51)	16+1,56 (A; 0,84; 0,63)	0,03+6,25 (A; 0,57; 1)	0,25+6,25 (A; 0,74; 0,75)	0,5+3,13 (A; 1,4; 1,5)
ROS /12,5-25	0,25+1,56 (A; 1,25; 0,53)	<u>8+6,25 (SZ-A; 6,16; 0,75)</u> 16+3,125 (A; 1,4; 0,75)	<u>0,03+6,25 (SZ-A; 0,91; 0,49)</u>	<u>0,03+12,5 (SZ-A; 2,2; 0,62)</u> <u>0,13+1,56 (SZ-A; 1,72; 0,56)</u>	0,25+3,13 (SZ-A; 0,7; 0,5)
SIM /6,25-12,5	-	4+6,25 (A; 0,78; 0,63) 16+1,56 (A; 1,19; 0,63)	<u>0,03+3,13 (SZ-A; 0,86; 0,49)</u> 0,06+0,39 (A; 1,17; 0,51)	0,25+3,13 (A; 0,69; 1)	<u>0,5+3,125 (SZ-A; 1,65; 1)</u>

A táblázatban szereplő jelölések magyarázata: / - Az adott hatóanyagra önmagában vonatkozó MIC₉₀ érték µg/ml-ben kifejezve. (A, SZ vagy SZ-A; IR; FIC1) - A zárójel előtt a MIC₉₀ értéket elérő hatóanyag kombinációk koncentrációi láthatók µg/ml-ben kifejezve, az első tag polién, vagy azol, a második tag minden esetben sztatín. A zárójelben található adatok a kölcsönhatás típusára utalnak. Az A- additív, SZ- szinergista kölcsönhatást jelenti (vastag, aláhúzott betű), SZ-A- egyik formula szerint szinergizmus, a másik szerint additív kölcsönhatás (aláhúzott betű).

9. B táblázat: A MIC₉₀ értéket elérő ATO, FLV, LOV, ROS, SIM és AMB, FLU, ITR, KET, MCZ kombinációk, illetve a kölcsönhatások típusa *B. spicifera* SZMC 13071 és SZMC 13075 izolátumok esetében.

	AMB	FLU	ITR	KET	MCZ
<i>B. spicifera</i> SZMC 13071	/0,13	/32	/1-2	/2	/4
ATO /25	-	-	0,5+3,13 (A; 1,17; 0,63)	1+25 (A; 1,15; 1)	-
FLV /3,13-6,25	0,06+1,56 (A; 0,59; 1)	16+3,125 (A; 1,05; 0,75)	-	1+1,56 (A; 0,94; 1)	2+1,56 (A; 0,68; 1)
LOV /25	<u>0,03+12,5 (SZ-A; 0,62; 0,5)</u>	-	-	-	2+12,5 (A; 0,68; 1)
ROS /25	-	-	0,5+12,5 (A; 1,16; 1)	-	-
SIM /25	-	-	<u>0,25+6,25 (SZ-A; 0,94; 0,38)</u>	1+12,5 (A; 0,72; 1)	2+12,5 (A; 0,56; 1)
SZMC 13075	/0,13	/32	/0,25	/2-4	/2
ATO /25	<u>0,06+0,39 (SZ-A; 1,5; 0,49)</u> 0,03+25 (A; 0,78, 1,24)	-	0,13+25 (A; 0,68; 1)	1+6,25 (A; 1,17; 0,75)	1+25 (A; 0,61; 1)
FLV /3,13	0,06+1,56 (A; 0,53; 0,98)	-	0,13+0,39 (A; 1,27; 0,62)	1+0,79 (A; 0,82; 0,76) 2+0,39 (A; 1,02; 0,75)	1+25 (A; 1,06; 1,25) 2+0,39 (A; 1,73; 0,52)
LOV /25	0,06+0,38 (A; 0,96; 0,51)	-	0,13+6,25 (A; 0,82; 0,75)	2+0,39 (A; 1; 0,52)	2+25 (A; 1,02; 1)
ROS /25	0,06+6,25 (A; 0,96; 0,73)	-	0,25+3,13 (A; 1,09; 0,54)	-	1+12,5 (A; 1,16; 1)
SIM /6,25-25	0,03+3,13 (A; 0,72; 0,74) 0,06+0,38 (A; 0,72; 0,54)	16+25 (A; 1,43; 1)	0,13+6,25 (A; 1,3; 0,75)	-	2+12,5 (A; 0,98; 1)

A táblázatban szereplő jelölések magyarázata: / - Az adott hatóanyagra önmagában vonatkozó MIC₉₀ érték µg/ml-ben kifejezve. (A, SZ vagy SZ-A; IR; FICI) – A zárójel előtt a MIC₉₀ értéket elérő hatóanyag kombinációk koncentrációi láthatók µg/ml-ben kifejezve, az első tag polién, vagy azol, a második tag minden esetben sztatín. A zárójelben található adatok a kölcsönhatás típusára utalnak. Az A- additív, SZ- szinergista kölcsönhatást jelenti (vastag, aláhúzott betű), SZ-A- egyik formula szerint szinergizmus, a másik szerint additív kölcsönhatás (aláhúzott betű).

9. C táblázat: A MIC₉₀ értéket elérő ATO, FLV, LOV, ROS, SIM és AMB, FLU, ITR, KET, MCZ kombinációk, illetve a kölcsönhatások típusa *B. spicifera* SZMC 13087 és SZMC 13088 izolátumok esetében.

	AMB	FLU	ITR	KET	MCZ
<i>B. spicifera</i> SZMC 13087					
ATO /≥25	/0,5 0,25+0,39 (A; 1,06; 0,52)	/64 -	/0,5 <u>0,25+12,5 (SZ-A; 3,06; 0,75)</u>	/2 1+6,25 (A; 1,1; 0,63)	/2-4 1+12,5 (A; 1,36; 0,75)
FLV /6,25	0,25+1,57 (A; 0,68; 0,75)	8+3,13 (A; 1,45; 0,75) 16+1,56 (A; 1,24; 0,75)	0,13+3,13 (A; 0,79; 1)	1+1,56 (A; 1,09; 0,75)	2+0,39 (A; 1,09; 0,62)
LOV /25	0,25+0,39 (A; 1,43; 0,52)	16+25 (A; 1,36; 0,75)	0,13+25 (A; 1,1; 0,75) 0,25+0,79 (A; 1,13; 0,52)	-	2+12,5 (A; 0,72; 1)
ROS /≥25	0,25+0,39 (A; 1,2; 0,52)	-	0,25+25 (A; 1,48; 1)	1+1,56 (A; 1,11; 0,53)	1+12,5 (A; 1,34; 0,75)
SIM /25	0,13+3,13 (A; 0,73; 0,75) 0,25+0,78 (A; 0,9; 0,56)	-	0,25+0,39 (A; 1,32; 0,51)	-	2+12,5 (A; 0,56; 1)
SZMC 13088					
ATO /≥25	/0,25 0,13+0,39 (A; 0,97; 0,52)	/64 -	/1 0,5+12,5 (A; 0,87; 0,75)	/4 2+12,5 (A; 1,19; 0,75)	/4 2+3,13 (A; 0,82; 0,56)
FLV /3,13-6,25	0,13+3,13 (A; 0,52; 1,5)	16+3,13 (A; 0,75; 0,63)	0,5+0,39 (A; 0,93; 0,63)	2+1,56 (A; 0,66; 1)	-
LOV /25	0,06+25 (A; 0,6; 1,25)	-	0,5+12,5 (A; 0,65; 1)	2+25 (A; 0,6; 1)	-
ROS /≥25	0,13+0,39 (A; 0,89; 0,52)	-	0,25+25 (A; 0,89; 0,75) 0,5+12,5 (A; 1,12; 0,75)	1+25 (A; 0,87; 0,75) 2+12,5 (A; 1,06; 0,75)	2+3,13 (A; 0,82; 0,56)
SIM /25	0,13+3,13 (A; 0,6; 0,75)	-	0,25+12,5 (A; 0,64; 0,75) 0,5+0,79 (A; 0,79; 0,53)	-	-

A táblázatban szereplő jelölések magyarázata: / - Az adott hatóanyagra önmagában vonatkozó MIC₉₀ érték µg/ml-ben kifejezve. (A, SZ vagy SZ-A; IR; FICI) - A zárójel előtt a MIC₉₀ értéket elérő hatóanyag kombinációk koncentrációi láthatók µg/ml-ben kifejezve, az első tag polién, vagy azol, a második tag minden esetben sztatín. A zárójelben található adatok a kölcsönhatás típusára utalnak. Az A- additív, SZ- szinergista kölcsönhatást jelent (vastag, aláhúzott betű), SZ-A- egyik formula szerint szinergizmus, a másik szerint additív kölcsönhatás (aláhúzott betű).

A FLU-sztatin kombinációkhoz hasonlóan, a KET-sztatin kombinációkkal szemben is sokkal érzékenyebbnek bizonyultak a *B. hawaiiensis* izolátumok, mint a *B. spicifera* törzsek. Az utóbbiak esetén, amennyiben kölcsönhatásba léptek a vegyületek egymással, a hatásuk additív volt. A KET-SIM kombináció esetén, az SZMC 13071 törzset leszámítva nem alakult ki számottevő kölcsönhatás. Ehhez hasonlóan a KET-ROS és KET-LOV kombinációk esetén is additív illetve indifferens kölcsönhatásokat tapasztaltunk csupán (**9. B, C táblázat**). Ezzel szemben, a *B. hawaiiensis* SZMC 13063 izolátum esetében az Abbott-formula szerint szinergizmus mutatható ki a KET-ATO, KET-FLV, KET-ROS és KET-SIM kombinációkban, míg az SZMC 13083 törzsnél csak a KET-ROS esetében. Minden más kombinációnál additív hatást mértünk (**9. A táblázat**). A már korábban említett tanulmányban (Nyilasi és mtsi. 2010) a KET és sztatin kombinációk élesztő fajok esetében mindig additív kölcsönhatásban állnak, míg fonalas gombáknál az additív hatás mellett gyakori az indifferens kapcsolat is. Szinergizmust egy *Rhizopus oryzae* izolátum KET-FLV, KET-ATO, KET-ROS és egy *A. fumigatus* törzs KET-ATO kombinációinál írtak le (Nyilasi és mtsi. 2010).

A *B. hawaiiensis* izolátumok esetén a MCZ-sztatin kombinációk általában semmilyen mérhető kölcsönhatást nem mutatnak. Egyedül az SZMC 13083 izolátumnál tapasztaltunk additív hatást a MCZ-LOV és MCZ-ROS, illetve az Abbott-formula szerint szinergista kölcsönhatást a MCZ-SIM kombinációk esetében (**9. A táblázat**). A *B. spicifera* SZMC 13075 és SZMC 13087 izolátumok esetén minden MCZ-sztatin kombináció kölcsönhatása additív volt, míg a másik két izolátumnál vagy additív, vagy indifferens hatást tapasztaltunk (**9. B, C táblázat**). A Nyilasi és munkatársai (2010) által készített tanulmányban a vizsgált *Candida* és fonalas gomba törzsek túlnyomó többségénél szintén additív kölcsönhatást mutattak a MCZ-sztatin kombinációk tesztelése során. Szinergizmust MCZ-SIM kombinációjánál mértek *A. flavus* esetén, illetve az MCZ-ATO kombinációnál *A. fumigatus* esetében.

Összegezve eredményeinket, a hatóanyag kombinációk tesztelése során túlnyomórészt additív kölcsönhatásokat tapasztaltunk, de izolátumtól függően egyes esetekben szinergizmust is megfigyeltünk. Antagonizmust azonban egyetlen esetben sem mértünk. A *B. hawaiiensis* izolátumok esetén a FLZ-sztatin kombinációk különösen hatékonyak voltak, egyértelmű, mindkét számolási módszerrel szinergizmust jelentő kombinációt (FLZ-FLV) azonban egyedül az SZMC 13063 izolátummal szemben figyeltünk meg. A *B. hawaiiensis* izolátumokkal szemben a FLZ mellett, az AMB-, ITR- és KET-sztatin kölcsönhatások is hatásosak voltak, de kisebb mértékben, mint a FLZ kombinációk. A MCZ-sztatin

kombinációk kevésbé voltak hatékonyak, mivel csak néhány esetben érték el a 90 %-os gátlást az alkalmazott koncentrációk mellett.

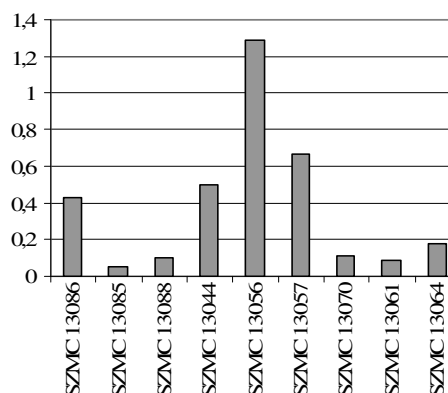
A *B. spicifera* izolátumokkal szemben az AMB-sztatin és ITR-sztatin kombinációk voltak hatásosak, melyek között additív kölcsönhatást tapasztaltunk. A *B. spicifera* izolátumok esetén mindkét index által támogatott, egyértelműen szinergisztikus hatást nem tudtunk megállapítani. A FLZ-sztatin kombinációk az esetek túlnyomó részében nem gátolták a gombák növekedését a vizsgált koncentráció értékeknél, és a KET-sztatin és MCZ-sztatin kombinációk is kevésbé voltak hatékonyak, mint az AMB-sztatin és ITR-sztatin kombinációk.

5.8. A *Bipolaris* nemzetség tagjai által termelt ophiobolinok és azok antimikrobiális hatása

Az ophiobolinok először fitotoxinokként váltak ismertté, de később antimikrobiális és citotoxikus hatásukat is kimutatták. E különleges, ciklikus szeszerterpén-típusú metabolitcsoport legismertebb tagja az ophiobolin A, mely ismert kalmodulin gátló (Leung és mtsi. 1984, Au és mtsi. 2000). Kísérleteink során megvizsgáltuk, hogy a humánpatogén fajok rendelkeznek-e ophiobolin A termelő képességgel.

Elvégeztük a folyadéktenyészetben nevelt *Bipolaris* törzsek fermentlevéből származó extraktum HPLC analízisét. Habár az általunk vizsgált humánpatogén izolátumok ophiobolin A termelése csak töredéke 0,1-1,3 µg/ml volt a korábban a Cochliobolus I csoportba tartozó növénypatogén izolátumok esetében tapasztaltak (pl. a *B. oryzae* NRRL 5233 izolátum ophiobolin A termelése 160 µg/ml körül van), azt kijelenthetjük, hogy képesek szeszerterpén típusú vegyületek szintézisére (**17. ábra**).

17. ábra: Opportunista humán kórokozó *Bipolaris* izolátumok ophiobolin A termelése 25 °C-on, PDA tápoldatban hat napos tenyésztés után. A mennyiségek µg/ml- ben lettek feltüntetve. A növénypatogén *B. oryzae* NRRL 5233 törzse azonos tenyésztési és kivonási körülmények mellett 160 µg/ml ophiobolin A-t termelt.



Az ophiobolin A sokféle hatással rendelkezik, de az ophiobolinok antimikrobiális aktivitásáról csak kevés adat áll rendelkezésünkre (Nakamura és Ishibashi 1958, Li és mtsi. 1995, Au és mtsi. 2000, Krizsán és mtsi. 2010). Ezért megvizsgáltuk a *Bipolaris*okra jellemző

ophiobolin A és ophiobolin B antimikrobiális hatását. Az *Aspergillus*, *Bacillus*, *Candida*, *Mucor*, *Rhizopus* és *Trichoderma* nemzetségek egyes tagjaival végzett előkísérletek során feltűnt, hogy mind az ophiobolin A, mind az ophiobolin B hatékonyan képes gátolni a járomspórás gombákhoz tartozó izolátumokat. Az opportunistá patogén, zigomikózist okozó fajokkal szemben hatékonyabb antifungális hatású szerek keresése intenzíven kutatott terület az izolátumok nagyfokú rezisztenciája miatt. Az előzetes eredmények alapján felmerült, hogy az ophiobolin vegyületek alkalmasak lehetnek a járomspórás gombák növekedésének visszaszorítására, ezért elvégeztük a *Micromucor*, *Mucor*, *Rhizomucor*, *Rhizopus* és *Gilbertella* nemzetségekhez tartozó izolátumok antimikrobiális érzékenységi tesztjét ophiobolin A-val és B-vel szemben. A **10. táblázatban** a kísérletben meghatározott MIC értékek láthatóak.

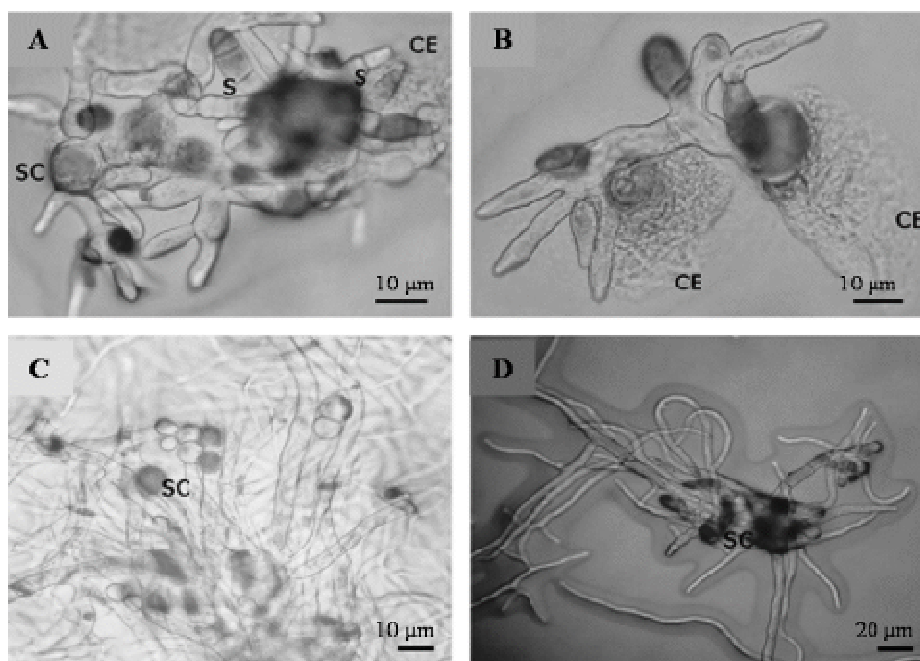
10. táblázat: Az ophiobolin A és B járomspórás gombákkal szemben MIC értékei µg/ml-ben kifejezve. A koncentráció értékek mellett az antifungális hatás típusát jelölő rövidítés látható: sz - fungisztatikus; c – fungicid hatás. µg/ml

MIC ₉₀ értékek (µg/ml)		
Vizsgált izolátumok	Ophiobolin A	Ophiobolin B
<i>Gilbertella persicaria</i> SZMC 11089	6,25 sz	25 sz
<i>Gilbertella persicaria</i> SZMC 11090	3,125 sz	25 sz
<i>Micromucor ramanniana</i> var. <i>ramanniana</i> NRRL 1296	12,5 sz	25 sz
<i>Mucor circinelloides</i> ATCC 1216b	12,5 sz	25 sz
<i>Mucor racemosus</i> SZMC 1501	12,5 sz	50 sz
<i>Mucor racemosus</i> SZMC 474	3,125 sz	50 sz
<i>Rhizomucor miehei</i> CBS 360.92	12,5 c	25 sz
<i>Rhizomucor pusillus</i> ETH M4920	12,5 c	25 sz
<i>Rhizopus microsporus</i> CBS 102.277	12,5 c	25 sz
<i>Rhizopus oryzae</i> NRRL 1526	6,25 c	50 sz
<i>Rhizopus oryzae</i> NRRL 2908	6,25 sz	25 sz
<i>Rhizopus oryzae</i> CBS 112.07	6,25 sz	25 sz
<i>Rhizopus oryzae</i> CBS 109.939	6,25 sz	25 sz
<i>Rhizopus niveus</i> CBS 403.51	3,125 sz	25 sz
<i>Rhizopus stolonifer</i> CBS 117.43	6,25 c	25 sz
<i>Rhizopus stolonifer</i> CBS 398.95	12,5 c	25 sz

A táblázat alapján jól látszik, hogy az ophiobolin A jobb gombaellenes hatással rendelkezik, mint az ophiobolin B. Az előbbi MIC₉₀ értéke 3,125-12,5 µg/ml koncentrációtartományban van, míg az utóbbi csak 25-50 µg/ml koncentrációban képes

gátolni a gombák növekedését. Összehasonlításként, az AMB MIC₉₀ értéke *Rhizopus* fajok esetén 1 µg/ml, a posakonazolé 0,5 µg/ml, az itraconazolé 4 µg/ml körüli érték. Továbbá *Mucor* fajoknál az AMB MIC értéke 0,125->2 µg/ml, a posakonazolé 0,25->1 µg/ml, míg az itraconazolé széles tartományban változik (Dannaoui és mtsi. 2003, Greenberg és mtsi. 2004, Nyilasi és mtsi. 2010). Járomspórás gombák ellen a VCZ és a FLU általában hatástalan, a TRB és az 5-flucitozin pedig nagyon magas koncentrációban képes csak gátolni a növekedésüket (Sun és mtsi. 2002, Greenberg és mtsi. 2004). Az ophiobolin A-ra vonatkozó MIC₉₀ értékét *A. flavus* és *C. albicans* izolátumokkal szemben 25 és 12,5 µg/ml koncentrációban állapították meg Li és munkatársai (1995).

A vizsgálatok során *M. circinelloides* és *R. niveus* esetében érdekes morfológiai változásokat figyeltünk meg ophiobolin A tartalmú YEG táptalajon történő tenyésztés során (18. ábra).

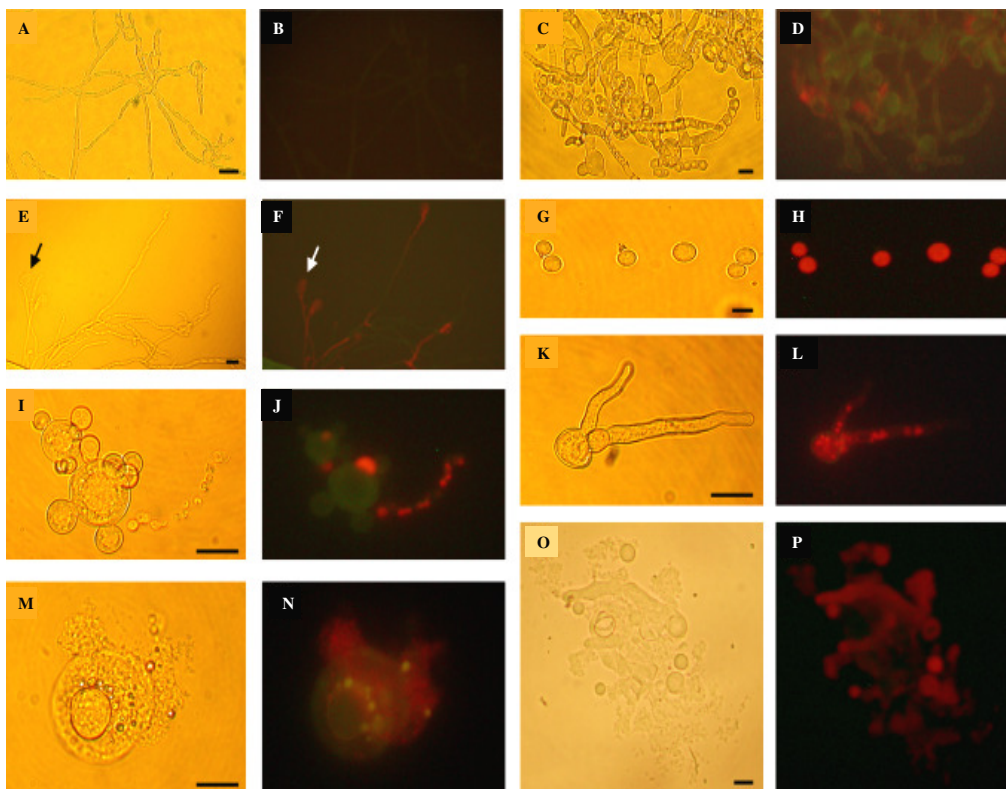


18. ábra: Ophiobolin A által indukált morfológiai változások *M. circinelloides* izolátumon 3,2 µg/ml (A, B), illetve 1,6 µg/ml (C, D) ophiobolin A tartalmú YEG táptalajon, 2 napos tenyésztést követően. A toxin hatására roncsolódott sejteken látható változások: s – szeptumok megjelenése, sc- megduzzadt sejtek, CE – citoplazma kiáramlás (Krizsán és mtsi. 2010).

A csírázó sporangiospórák a cönocitikus hifák helyett szeptált, duzzadt sejteket hordozó fonalakat növesztettek 3,2 µg/ml ophiobolin A kezelés hatására (18. A ábra),

emellett a súlyosan károsodott sejtekből plazmakiáramlás is megfigyelhető volt (**18. B ábra**). Amennyiben a letális koncentráció (1,6 µg/ml) alatti koncentrációban adtuk a tápközeghez a toxint, a sejtek idővel képesek voltak leküzdeni az ophiobolin A hatását, és normális hifákat képeztek (**18. C, D ábra**). Folyadéktenyészetekben még erőteljesebben kifejeződött az ophiobolin A gombasejtet károsító hatása. A spornagiospórák leoltásával egy időben hozzáadott toxin koncentrációfüggő módon gátolta a csíratömlőképzést (**19. ábra C, D, G, H M, N**). A sporangiospórák előtenyésztését követően (leoltást követő 4. órában) hozzáadott toxin abnormális csíratömlő- és hifaképzést, illetve a hifa csúcsi sejtjéből plazmakiáramlást okozott (**19. ábra E, F, I, J, K, L,; O, P**).

Az ophiobolin A antifungális hatásának pontos mechanizmusa nem ismert, de a *Phytophthora capsicivel* végzett vizsgálatok alapján egy β -1,3-glükán szintetáz gátlással kapcsolt utat feltételeznek (Fukushima és mtsi. 1993). Sokkal szélesebb körben tanulmányozták a vegyület fitotoxikus hatását, melyről a korai kísérletek megállapították, hogy a növényi sejtmembránt és a membrántranszport mechanizmusokat ronsolja (Cocucci és mtsi. 1983). Ezt követően kukoricában kimutatták, hogy képes kapcsolódni a jelátvitelben közreműködő kalmodulinhoz (Leung és mtsi. 1984), sőt mára az is bebizonyosodott, hogy a patogenezis során az ophiobolin A elsődleges célpontja a növényi kalmodulin 75. pozícióban található lizinje, de továbbá a gátlás folyamatában a 77. és 148. pozícióban található lizinnel való kapcsolat is szerepet játszik (Au és Leung 1998, Au és mtsi. 2000). A kalmodulin szerepe a gombák morfogenezisében, sejtciklusának normális működésében, emellett a csíratömlőképzésben és a hifa megnyúlási és elágazási folyamataiban is meghatározó (Osharov és May 2001, Zelter és mtsi. 2004). Továbbá kimutatták a kalcium-kalmodulin szignalizációs út szerepét a gomba sejthalál és stressz-válasz folyamatainak szabályozásában (Ramsdale 2006). Emiatt megvizsgáltuk, hogy az ophiobolin A által járomspórás gombákban kiváltott apoptotikus jellegű változások hátterében a kalmodulin szignalizációs út működésének akadályozása áll-e. A vizsgálatokat folyadék tenyészetben ophiobolin A jelenlétében nevelt gombákon annexin V-FITC és propidium-jodid alapú apoptózis detektáló teszttel végeztük. Az annexin V-FITC kötődik a foszfatidil-szerinhez, mely az apoptózis kezdeti szakaszában a membrán dezorganizáció miatt, a sejtmembrán belső oldaláról a külső környezet felé fordul. A propidium-jodid a roncsolódott sejtmembránon keresztül bejut a sejtbe, és kapcsolódik a DNS-hez. Az élő, sértetlen sejtek sem annexin V-FITC, sem propidium-jodidos festődést nem mutatnak (**19. B ábra**).

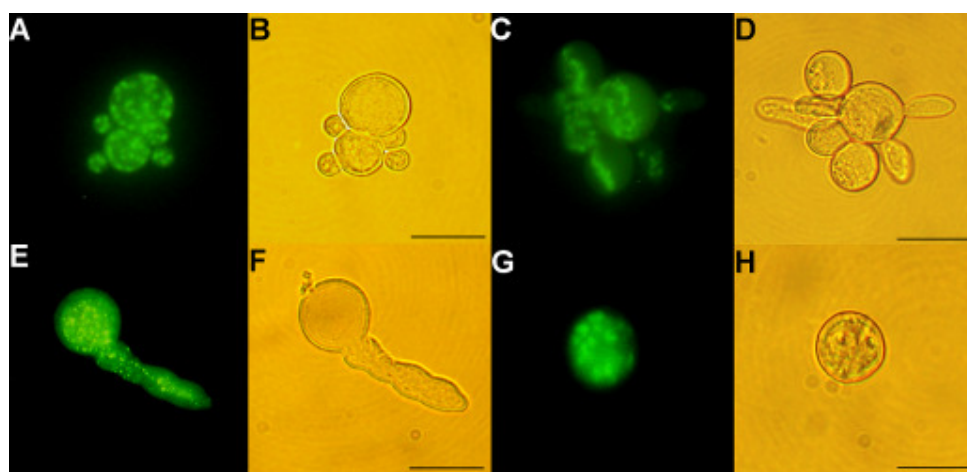


19. ábra: Fénymikroszkópos, illetve annexin V-FITC és propidium-jodid festett fluoreszcens mikroszkópos képek *M. circinelloides* különböző koncentrációjú ophiobolin A-t tartalmazó folyadéktenyészeiből. **A, B** – ophiobolin A mentes tápközeg; **C, D** – 1,6 $\mu\text{g/ml}$ ophiobolin A a sporangiospórákkal egyidejűleg leoltva (0 óra); **E, F** - 1,6 $\mu\text{g/ml}$ ophiobolin A a sporangiospórák leoltását követően 4 órával hozzáadva; **G, H** – 3,2 $\mu\text{g/ml}$ ophiobolin A a sporangiospórákkal egyszerre leoltva (0 óra); **I, J, K, L** – 3,2 $\mu\text{g/ml}$ ophiobolin A az előnevelt tenyészethez keverve 4 óra elteltével; **M, N** – 6,25 $\mu\text{g/ml}$ ophiobolin A a sporangiospórákkal együtt leoltva (0 óra); **O, P** – 6,25 $\mu\text{g/ml}$ ophiobolin A-t a sporangiospórák 4 órás előtenyésztését követően hozzáadva. A felvételek ophiobolin A-val 5 órán keresztül történő együttes tenyésztést követően készültek. A mérővonal hossza 10 μm . A nyílak a hifa csúcsi sejtjeinek plazmakifolyását jelölik.

Bár az 1,6 $\mu\text{g/ml}$ ophiobolin A koncentrációt képesek leküzdeni a sejtek és morfológiailag a kezeletlen tenyészetéhez hasonló képet mutatnak, az annexin (zöld) és propidium-jodidos (piros) festődés alapján az apoptotikus folyamatokra utaló festődést mutattak (**19. ábra D, F**). Ha a sporangiospórákat 3,2 $\mu\text{g/ml}$ ophiobolin A tartalmú tápközegbe oltottuk a csíratömlőképzés teljesen gátolt volt (**19. ábra G, I**). Négy órás előtenyésztést követően hozzáadott toxin a képződő hifák növekedését gátolta és duzzadt hifaszegmentek megjelenését eredményezte (**19. ábra K**). A fluoreszcens vizsgálatok többségében már a késői fázisban lévő sejthalálra jellemző propidium-jodidos festődést mutatták az ophiobolin A-val együtt tenyésztett gombasejtek. Ekkorra, a membránok teljes

dezorganizációja miatt, már az annexin festődés sem látható (19. ábra H). A leoltás után 4 órával kezelt tenyészetek mindkét festékkel reagálnak (19. ábra J, L). Nagyobb koncentrációjú (6,25 µg/ml) ophiobolin A-val kezelt tenyészetek esetén, a hozzáadás idejétől függetlenül, minden esetben teljesen dezorganizált sporangiospórákat és hifákat láthattunk (19. ábra M, O), melyek propidium-jodidos festődést mutattak (19. ábra N, P).

A DAPI fluoreszcens festékkel a sejtmagi struktúra felbomlását detektáltuk. *M. circinelloides* esetén már 0,7 µg/ml ophiobolin A (20. ábra C, D), míg *R. stolonifer* esetén 6,25 µg/ml koncentrációban alkalmazott ophiobolin A (20. ábra G, H) eredményezte a sejtmag dezorganizációját.



20. ábra: Fény- és fluoreszcens mikroszkópos felvételek DAPI-val festett *M. circinelloides* (A-D) és *R. stolonifer* (E-H) sporangiospórák ophiobolin A hatására bekövetkező morfológiai változásáról. A, B és E, F - ophiobolin A-val nem kezelt sporangiospórák; C, D - 0,7 µg/ml ophiobolin A a sporangiospórákkal egyidejűleg leoltva; G, H - 6, 25 µg/ml ophiobolin A a spórákkal egyidejűleg leoltva. A felvételek ophiobolin A-val történő órák együttes tenyésztést követően készültek. A mérővonal hossza 25 µm.

Bár a programozott sejthalál mára már ismert jelenség a gombák körében is (Ramsdale 2006, Sharon és mtsi. 2008), a járomspórás gombákra vonatkozóan azonban eddig csak egy tanulmány készült, amelyben *M. racemosus* esetén számoltak be lovasztatin kezelés hatására bekövetkező apoptotikus jellegű változásokról (Rose és Linz 1998). A kísérletükben megfigyelhető sporangiospóra csírázás gátlása, illetve a degenerált hifaszegmentek megjelenése nagyon hasonlít az általunk megfigyelt változásokhoz, továbbá megerősíti a sejtést, hogy gombáknál az apoptózis kialakításában szerepet játszik egy kalmodulin-kalcineurin függő út vonal is (Sharon és mtsi. 2008).

6. IRODALOMJEGYZÉK

- Alcorn JL (1978) Two new *Cochliobolus* species. *T Brit Mycol Soc* 70: 61-65.
- Alcorn JL (1983a) Generic concepts in *Drechslera*, *Bipolaris* and *Exserohilum*. *Mycotaxon* 17: 1-86.
- Alcorn JL (1983b) On the genera *Cochliobolus* and *Pseudocochliobolus*. *Mycotaxon* 16: 353–379.
- Ali TH, Ali NH, Mohamed LA (2011) Production, purification and some properties of extracellular keratinase from feathers degradation by *Aspergillus oryzae* NRRL-447. *J Appl Sci in Env Sanit* 6 (2): 123-136.
- Alp S, Arıkan S (2008) Investigation of extracellular elastase, acid proteinase and phospholipase activities as putative virulence factors in clinical isolates of *Aspergillus* species. *J Basic Microb* 48: 331-337.
- Anandi V, Suryawanshi NB, Koshi G, Padhye AA, Ajello L (1988) Corneal ulcer caused by *Bipolaris hawaiiensis*. *J Med Vet Mycol* 26: 301-306.
- Andriole VT (1999) Current and future antifungal therapy: new targets for antifungal agents. *J Antimicrob Chemoth* 44: 151-162.
- Apoga D, Akesson H, Jansson H, Odham G. 2002. Relationship between the production of the phytotoxin prehelminthosporol and virulence in isolates of *Bipolaris sorokiniana*. *Eur J Plant Pathol* 108: 519–526.
- Au TK, Leung CP (1998) Identification of the binding and inhibition sites in the calmodulin molecule for ophiobolin A by site-directed mutagenesis. *Plant Physiol* 118 (3): 965-973.
- Au TK, Chick WSH, Leung PC (2000) The biology of ophiobolins. *Life Sci* 67: 733-742.
- Bálint-Kürti PJ, Krakowsky MD, Jines MP, Robertson LA, Molnár TL, Goodman MM, Holland JB (2006) Identification of quantitative trait loci for resistance to southern leaf blight and days to anthesis in a maize recombinant inbred line population. *Phytopathology* 96 (10): 1067-1071.
- Barnett JA, Payne RW, Yarrow D (2000) Yeasts: Characteristics and identification. 3rd edn. Cambridge University Press, Cambridge.
- Barrios-Gonzales J, Miranda RU (2010) Biotechnological production and application of statins. *Appl Microbiol Biot* 85 (4): 869-893.
- Bashir G, Hussain W, Rizvi A (2009) *Bipolaris hawaiiensis*: keratomycosis and endophthalmitis. *Mycopathologia* 167 (1): 51-53.

- Bava AJ, Fayad A, Cespedes C, Sandoval M (2003) Fungal peritonitis caused by *Bipolaris spicifera*. *Med Mycol* 41: 529-531.
- Bellosta S, Paoletti R, Corsini A (2004) Safety of statins: focus on clinical pharmacokinetics and drug interactions. *Circulation* 109: 50-57.
- Benkő I, Hernádi F, Megyeri A, Kiss A, Somogyi G, Tegyei Z, Kraicsovits F, Kovács P (1999) Comparison of the toxicity of the fluconazole and other azole antifungal drugs to murine and human granulocyte-macrophage progenitor cells *in vitro*. *J Antimicrob Chemoth* 43: 675-681.
- Berbee ML, Pirseyedi M, Hubbard S (1999) *Cochliobolus* phylogenetics and the origin of known, highly virulent pathogens, inferred from ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. *Mycologia* 91 (6): 964-977.
- Berestetskiy AO (2008) A review of fungal phytotoxins: from basic studies to practical use. *Appl Biochem Micro* 44 (5): 453-465.
- Bilu D, Movahedi-Lankarani S, Kazin RH, Shields C, Moresi M (2004) Cutaneous *Bipolaris* infection in a neutropenic patient with acute lymphoblastic leukemia. *J Cutan Med Sy: Incorporating Medical and Surgical Dermatology* 8 (6): 446-449.
- Boedijn KB (1955) Über einige phragmosporen dematiazen. *Bull Jard Bot Buitenzorg* 13: 120-134.
- Brandt ME, Warnock DW (2003) Epidemiology, clinical manifestations, and therapy of infections caused by dematiaceous fungi. *J Chemotherapy* 15 (2): 36-47.
- Briquet M, Vilret D, Goblet P, Mesa M, Eloy M-C (1998) Plant cell membranes as biochemical targets of the phytotoxin helminthosporol. *J Bioenerg Biomembr* 30 (3): 285-295.
- Buzina W, Braun H, Schimpl K, Stammberger H (2003) *Bipolaris spicifera* causes fungus balls of the sinuses and triggers polypoid chronic rhinosinusitis in an immunocompetent patient. *J Clin Microbiol* 41 (10): 4885-4887.
- CAB International (2003) Distribution Maps of Plant Diseases. Ed. 6. Map 346. Wallingford, UK: CAB International.
- Canonica L, Fricchi A, Galli Kienle U, Scala A (1966) Isolation and constitution of cochliobolin b. *Tetrahedron Lett* 7 (13): 1329-1333.
- Castelnuovo P, De Bernardi F, Cavanna C, Pagella F, Bossolesi P, Marone P, Farina C (2004) Invasive fungal sinusitis due to *Bipolaris hawaiiensis*. *Mycoses* 47: 76-81.
- Chakrabati A (2008) Epidemiology of central nervous system mycosis. *Neurol India* 55: 191-197.

- Chalet HH, McGinnis MR, Zapatero I (1986) Isolation of *Bipolaris australiensis* from a lesion of viral vesicular dermatitis on the scalp. *J Med Vet Mycol* 24: 461-465.
- Chamilos G, Lewis RE, Kontoyiannis DP (2006) Lovastatin has significant activity against Zygomycetes and interacts synergistically with voriconazole. *Antimicrob Agents Ch* 50 (1): 96-103.
- Chattopadhyay AK, Samaddar KR (1976) Effects of *Helminthosporium oryzae* infection and ophiobolin on the cell membranes of host tissues. *Physiol Plant Pathol* 8: 131-139.
- Chin N-X, Weitzman I, Della-Latta P (1997) In vitro activity of fluvastatin, a cholesterol-lowering agent and synergy with fluconazole and itraconazole against *Candida* species and *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Ch* 41 (4): 850-852.
- Chowdhary A, Randhawa HS, Singh V, Khan ZU, Ahmad S, Kathuria S, Roy P, Khanna G, Chandra J (2011) *Bipolaris hawaiiensis* as etiologic agent of allergic bronchopulmonary mycosis: first case in a paediatric patient. *Med Mycol* 49 (7): 760-765.
- Cocucci S, Morgutti S, Cocucci M, Gianani L (1983) Effects of ophiobolin A on potassium permeability, transmembrane electrical potential and proton extrusion in maize roots. *Plant Sci Lett* 32: 9-16.
- Costa AR, Porto E, Tabuti AH, Lacaz CS, Sakai-Valente NY, Maranhao WN, Rodrigues MC (1991) Subcutaneous phaeohyphomycosis caused by *Bipolaris hawaiiensis*. A case report. *Rev I Med Trop* 33: 74-79.
- da Cunha KC, Sutton DA, Fothergill AW, Cano J, Gené J, Madrid H, de Hoog S, Crous PW, Guarro J (2012) Diversity of *Bipolaris* species in clinical samples in the USA and their antifungal susceptibility profiles. *J Clin Microbiol* DOI: 10.1128/JCM.01965-12.
- Cutler HG, Farrist GC, Cox RH, Springer JP, Arrendale RF, Cole RJ, Cole PD (1984) Ophiobolin G and H: new fungal metabolites from a novel source, *Aspergillus ustus*. *J Agr Food Chem* 32 (4): 778-782.
- Dannaoui E, Meis JFG, Loenberg D, Verweji PE (2003) Activity of posaconazole in treatment of experimental disseminated zygomycosis. *Antimicrob Agents Ch* 47 (11): 3647-3650.
- Davis EM, Croteau R (2000) Cyclization enzymes in the biosynthesis of monoterpenes, sesquiterpenes, and diterpenes. *Top Cur Chem* 209: 53-93.
- Denning DW, Radford SA, Oakley K, Hall L, Johnson EM, Warnock DW (1997) Correlation between in-vitro susceptibility testing to itraconazole and in-vivo outcome for *Aspergillus fumigatus* infection. *J Antimicrob Chemoth* 40: 401-414.

- Dewick PM (2002) The biosynthesis of C₅-C₂₅ terpenoid compounds. *Nat Prod Rep* 19: 181-222.
- Drechsler C (1925) Leafspot of maize caused by *Ophiobolus heterostrophus*, N. sp. the ascigerous stage of a *Helminthosporium* exhibiting bipolar germination. *J Agr Res* 31 (8): 701-726.
- Drechsler C (1934) Phytopathological and taxonomic aspects of *Ophiobolus*, *Pyrenophora*, *Helminthosporium*, and a new genus, *Cochliobolus*. *Phytopathology* 24: 973-983.
- Drummond AJ, Rambaut A (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *Bmc Evol Biol* 7: 8.
- Dyer ZA, Wright RS, Rong IH, Jacobs A (2008) Back pain associated with endobronchial mucus impaction due to *Bipolaris australiensis* colonization representing atypical Allergic Bronchopulmonary Mycosis. *Med Mycol* 46 (6): 589-594.
- Ebright JR, Chandrasekar PH, Marks S, Fairfax MR, Aneziokoro A, McGinnis MR (1999) Invasive sinusitis and cerebritis due to *Curvularia clavata* in an immunocompetent adult. *Clin Infect Dis* 28: 687-689.
- Egthedari M (2006) Asymptomatic fungal cyst of conjunctiva caused by *Bipolaris spicifera*. *IJMS Israel J Med Sci* 31 (1): 56-58.
- Ellis D (2002) Amphotericin B: spectrum and resistance. *J Antimicrob Chemoth* 49 (1): 7-10.
- Espinel-Ingroff A, Goldson PR, McGinnis MR, Kerkering TM (1988) Evaluation of proteolytic activity to differentiate some dematiaceous fungi. *J Clin Microbiol* 26 (2): 301-307.
- Espinel-Ingroff A (1998) In vitro activity of the new triazole voriconazole (UK-109,496) against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and common and emerging yeast pathogens. *J Clin Microbiol* 36 (1): 198-202.
- Espinel-Ingroff A (2001) In vitro fungicidal activities of voriconazole, itraconazole, and amphotericin B against opportunistic moniliaceous and dematiaceous fungi. *J Clin Microbiol* 39 (3): 954-958.
- Espinel-Ingroff A, Chaturvedi V, Fothergill A, Rinaldi MG (2002) Optimal testing conditions for determining MICs and minimum fungicidal concentrations of new and established antifungal agents for uncommon molds: NCCLS collaborative study. *J Clin Microbiol* 40 (10): 3776-3781.
- Fernandez MD, Noyola E, Rossmann SN, Edwards MS (1999) Cutaneous phaeohyphomycosis caused by *Curvularia lunata* and a review of *Curvularia* infections in pediatrics. *Pediat Infect Dis J* 18: 727-731.

- Ferrer C, Montero J, Alió JL, Abad JL, Ruiz-Moreno JM, Colom F (2003) Rapid molecular diagnosis of posttraumatic keratitis and endophthalmitis caused by *Alternaria infectoria*. *J Clin Microbiol* 41 (7): 3358–3360.
- Flanagan KL, Bryceson AD (1997) Disseminated infection due to *Bipolaris australiensis* in a young immunocompetent man: case report and review. *Clin Infect Dis* 25: 311-313.
- Fothergill AW (1996) Identification of dematiaceous fungi and their role in human disease. *Clin Infect Dis* 22 (8/2): 8179-8184.
- Friedrich J, Gradisar H, Mandin D, Chaumont JP (1999) Screening fungi for synthases of keratinolytic enzymes. *Lett Appl Microbiol* 28: 127-130.
- Fryen A, Mayser P, Glanz H, Fussle R, Breithaupt H, de Hoog GS (1999) Allergic fungal sinusitis caused by *Bipolaris (Drechslera) hawaiiensis*. *Eur Arch Oto-rhino-l* 256: 330-334.
- Fujiwara H, Matsunaga K, Kumagai H, Ishizuka M, Ohizumi Y (2000) Ophiobolin A, a novel apoptosis-inducing agent from fungus strain f-7438. *Pharmacol Res Commun* 6: 427-431.
- Fukushima Y, Sakagami Y, Marumo S (1993) β -Glucan biosynthesis inhibitors isolated from fungi as hyphal malformation inducer. *Bioorg Med Chem Lett* 3: 1219-1222.
- Gácsér A, Trofa D, Schäfer W, Nosanchuk JD (2007) Targeted gene deletion in *Candida parapsilosis* demonstrates the role of secreted lipase in virulence. *J Clin Invest* 117 (10): 3049-3058.
- Gadallah MF, White R, El-Shahawy MA, Abreo F, Oberle A, Work J (1995) Peritoneal dialysis complicated by *Bipolaris hawaiiensis* peritonitis: successful therapy with catheter removal and oral itraconazole without the use of amphotericin-B. *Am J Nephrol* 15: 348-352.
- Galgóczy L, Nyilasi I, Papp T, Vágvölgyi Cs (2009) Are statins applicable for the prevention and treatment of Zygomycosis? *CID* 49 (1): 483-484.
- Galgóczy L, Lukács G, Nyilasi I, Papp T, Vágvölgyi Cs (2010) Antifungal activity of statins and their interaction with amphotericin B against clinically important Zygomycetes. *Acta Biol Hung* 61: 356-365
- Galgóczy L, Nyilasi I, Papp T, Vágvölgyi Cs (2011) Statins as antifungals. *World J Clin Infect Dis* 1 (1): 4-10.
- Garcia-Effron G, Gomez-Lopez A, Mellado E, Monzon A, Rodriguez-Tundela JL, Cuenca-Estrella M (2004) *In vitro* activity of terbinafine against medically important non-dermatophyte species of filamentous fungi. *J Antimicrob Chemoth* 53: 1086–1089.

- Garg P, Gopinathan U, Choudhary K, Rao GN (2000) Keratomycosis: Clinical and microbiologic experience with dematiaceous fungi. *Ophthalmology* 107: 574–580.
- Gaur A, Dev U, Mitter V (2006) Pathological and taxonomical aspects of the genera *Drechslera*. In: Current concepts of botany. Mukerji KG, Manoharachary C, I K International Pvt Ltd 5: 49-78.
- Gehlot P, Attitalla IH, Salleh B (2010) Anamorphic fungi: an overview. *Middle East J Sci Res* 6: 201–208.
- Geimba MP, Brandelli A (2002) Extracellular enzymatic activities of *Bipolaris sorokiniana* isolates. *J Basic Microb* 42 (4): 246-253.
- Geiser DM, Klich MA, Frisvad JC, Peterson SW, Varga J, Samson RA (2007) The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Stud Mycol* 59: 1-10.
- Ghannoum MA, Rice LB (1999) Antifungal agents: Mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin Microbiol Rev.* 12 (4): 501–517.
- Gisi U (1996) Synergistic action of fungicides in mixtures. *Phytopathology* 86: 1273-1279.
- Glasmacher A, Hahn C, Molitor E, Marklein G, Sauerbruch T, Schmidt-Wolf IG (1999) Itraconazole through concentrations in antifungal prophylaxis with six different dosing regimens using hydroxypropyl-beta-cyclodextrin oral solution or coated-pellet capsules. *Mycoses* 42: 591-600.
- Goh T (1998) Generic distinction in the *Helminthosporium*-complex based on restriction analysis of the nuclear ribosomal RNA gene. *Fungal Divers* 1: 109–113.
- Gomes Müller MV, Germani JG, Van der Sand ST (2005) The use of RAPD to characterize *Bipolaris sorokiniana* isolates. *Genet Mol Res* 4 (4): 642-652.
- Greenberg RN, Scott LJ, Vaughn HH, Ribes JA (2004) Zygomycosis (mucormycosis): emerging clinical importance and new treatments. *Curr Opin Infect Dis* 17: 517–525.
- Guarro J, Akiti T, Almada-Horta R, Leite LAM, Gene J, Ferreira-Gomes S, Aguilar C, Ortoneda M (1999) Mycotic keratitis due to *Curvularia senegalensis* and in vitro antifungal susceptibilities of *Curvularia* spp. *J Clin Microbiol* 37: 4170-4173.
- Gugnani HC, Okeke CN, Sivanesan A (2008) *Curvularia clavata* as an aetiological agent of human skin infection. *Lett Appl Microbiol* 10 (1): 47–49.
- Hagedorn C, Crozie JB, Mentz KA, Booth AM, Graves AK, Nelson NJ, Reneau RB (2003) Carbon source utilization profiles as a method to identify sources of faecal pollution in water. *J Appl Microbiol* 94: 792-799.

- Halaby T, Boots H, Vermeulen A, van der Ven A, Beguin H, van Hooff H, Jacobs J (2001) Phaeohyphomycosis caused by *Alternaria infectoria* in a renal transplant recipient. *J Clin Microbiol* 39 (5): 1952-1955.
- Hall MJ, Middleton RF, Westmacott D (1983) The fractional inhibitory concentration (FIC) index as a measure of synergy *J Antimicrob Chemoth* 11 (5): 427-433.
- Hawksworth (2011) A new dawn for the naming of fungi: impacts of decisions made in Melbourne in July 2011 on the future publication and regulation of fungal names. *MycKeys* 1: 7-20.
- Hemashettar BM, Veerappa TS, Verma PV, Hanchinamani S, Patil CS, Thammayya A (1992) Mycotic keratitis caused by *Bipolaris spicifera*. *Indian J Pat Microbiol* 35: 274- 277.
- Hillis DM, Dixon MT (1991) Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Quart Rev Biol* 66: 411-453.
- Hitchcock C, Dickinson K, Brown SB, Evans EG, Adams DJ (1990) Interaction of azole antifungal antibiotics with cytochrome P450-dependent 14 α -sterol demethylase purified from *Candida albicans*. *J Biochem* 266: 475-480.
- Hogan LH, Klein BS, Levitz SM (1996) Virulence factors of medically important fungi. *Clin Microbiol Rev* 9 (4): 469-488.
- Hoge R, Pelzer A, Rosenau F, Wilhelm S (2010) “Weapons of a pathogen: Proteases and their role in virulence of *Pseudomonas aeruginosa*”. In: Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, Mendez-Vilas A, Formatex Research Center pp 383-395.
- Hong S-B, Go S-J, Shin H-D, Frisvad JC, Samson RA (2005) Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. *Mycologia* 97 (6): 1316-1329.
- Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17: 754-755.
- Ikeda R, Sugita T, Jacobson ES, Shinoda T (2003) Effects of melanin upon susceptibility of *Cryptococcus* to antifungals. *Microbiol Immunol* 47: 271-277.
- Itai A, Nozoe S, Tsuda K, Iitaka Y, Nakayama Y (1967) The structure of cephalonic acid, a pentaprenyl terpenoid. *Tetrahedron Lett* 8 (42): 4111-4112.
- Ito S (1930) On some new ascigerous stages of the species of *Helminthosporium* parasitic on cereals. *P Imp Ac Jpn* 6 (8): 352-355.
- Jacobson ES (2000) Pathogenic roles for fungal melanins. *Clin Microbiol Rev* 13: 708-717.
- Jain PC, Agrawal C (1980) A note on the keratin decomposing capability of some fungi. *T Mycol Soc Jpn* 21 (4): 513-517.

- Kaul S, Sumbali G (2000) Production of extracellular keratinase by keratinophilic fungal species inhabiting feathers of living poultry birds (*Gallus domesticus*): A comparison. *Mycopathologia* 146: 19-24.
- Knapp CF, Tucci VT, Sandin RL, Greene JN (2008) Cutaneous *Curvularia* infection in a neutropenic patient. *Asian Biomedicine* 2 (5): 393-395.
- Kodsueb R, Dhanasekaran V, Aptroot A, Lumyong S, McKenzie EHC, Hyde KD, Jeewon R (2006) The family Pleosporaceae: intergeneric relationships and phylogenetic perspectives based on sequence analyses of partial 28S rDNA. *Mycologia* 98 (4): 571–583.
- Korabecna M (2007) The variability in the fungal ribosomal DNA (ITS1, ITS2, and 5.8 S rRNA Gene): its biological meaning and application in medical mycology. In: Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology, Mendez-Vilas A, Formatex Research Center pp 783-787.
- Kothary MH, Chase T, Macmillen JD (1984) Correlation of elastase production by some strains of *Aspergillus fumigatus* with ability to cause pulmonary invasive aspergillosis in mice. *Infect Immun* 43 (1): 320-325.
- Kredics L, Varga J, Kocsubé S, Dóczy I, Samson RA, Rajamaran R, Venkatapathy N, Bhaskar M, Vágvolgyi Cs, Manikandan P (2009) Case of keratitis caused by *Aspergillus tamarii*. *J Clin Microbiol* 45 (10): 3464-3467.
- Krizsán K, Bencsik O, Nyilasi I, Galgóczy L, Vágvolgyi Cs, Papp T (2010) Effect of the sesterterpene-type metabolites, ophiobolin A and B on zygomycetes fungi. *FEMS Microbiol Lett* 313 (2): 135-140.
- Kumar J, Schäffer P, Hückelhoven R, Langen G, Baltruschat H, Stein E, Nagarajan S, Kogel KH (2002) *Bipolaris sorokiniana*, a cereal pathogen of global concern: cytological and molecular approaches towards better control. *Mol Plant Pathol* 3 (4): 185-195.
- Kumar M, Shukla PK (2005) Use of PCR targeting of internal transcribed spacer regions and Single-Stranded Conformation Polymorphism analysis of sequence variation in different regions of rRNA genes in fungi for rapid diagnosis of mycotic keratitis. *J Clin Microbiol* 43 (2): 662-668.
- Lalitha P, Vijaykumar R, Prajna NV, Fothe AW (2008) In vitro natamycin susceptibility of ocular isolates of *Fusarium* and *Aspergillus* species: Comparison of commercially formulated natamycin eye drops to pharmaceutical-grade powder. *J Clin. Microbiol* 46 (10): 3477-3478.

- Laniado-Laborín R, Cabrales-Vargas MN (2009) Amphotericin B: side effects and toxicity. *Rev Iberoan Micol* 26 (4): 223-227.
- Latham RH (2000) *Bipolaris spicifera* meningitis complicating a neurosurgical procedure. *Scand J Infect Dis* 32: 102-103.
- Leonard KJ, Suggs EG (1974) *Setosphaeria prolata*, the ascigerous state of *Exserohilum prolatum*. *Mycologia* 66: 281-297.
- Leung PC, Taylor WA, Wang JH, Tipton CL (1984) A natural product inhibitor of calmodulin. *J Biol Chem* 259 (5): 2742-2747.
- Levi A, Rowland LJ, Hartung JS (1993) Production of reliable random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers from DNA of woody plant. *Hortscience* 28: 1188-1190.
- Levings CSI, Rhoads DM, Siedow JN (1995) Molecular interactions of *Bipolaris maydis* T-toxin and maize. *Can J Bot* 73 (1): 483-489
- Li E, Clark AM, Rotella DP, Hufford CD (1995) Microbial metabolites of ophiobolin A and antimicrobial evaluation of ophiobolins. *J Nat Prod* 58: 74-81.
- Link HF (1809) In: *Mag. Gesell. naturf. Freunde, Berlin* 3(1-2):10.
- Lorenz RT, Parks LW (1990) Effects of lovastatin (mevinolin) on sterol levels and on activity of azoles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob Agents Chemoth* 34 (9): 1660-1665.
- Luttrell ES (1964) Systematics of *Helminthosporium* and related genera. *Mycologia* 56: 119-132.
- Macreadie IG, Johnson G, Schlosser T, Macreadie PI (2006) Growth inhibition of *Candida* species and *Aspergillus fumigatus* by statins. *FEMS Microbiol Lett* 262 : 9-13.
- Manamgoda DS, Cai L, Bahkali AH, Chukeatirote E, Hyde KD (2011) *Cochliobolus*, an overview and current status of species. *Fungal Divers* 51: 3-42.
- Manamgoda DS, Cai L, McKenzie EHC, Crous PW, Madrid H, Chukeatirote E, Shivas RG, Tan YP, Hyde KD (2012) A phylogenetic and taxonomic re-evaluation of the *Bipolaris* - *Cochliobolus* - *Curvularia* complex. *Fungal Divers* 56: 131-144.
- Manikandan PP, Varga J, Kocsubé S, Samson RA, Anita R, Revathi R, Dóczy I, Németh TM, Venkatapathy Narendran V, Vágvolgyi Cs, Manoharan C, Kredics L (2009) Mycotic keratitis due to *Aspergillus nomius*. *J Clin Microbiol* 47 (10): 3382-3385.
- Mazzu AL, Lasseter KC, Shamblen EC, Agarwal V, Lettieri J, Sundaresen P (2000) Itraconazole alters the pharmacokinetics of atorvastatin to a greater extent than either cerivastatin or pravastatin. *Clin Pharmacol Ther* 68(4): 391-400.

- McGinnis MR, Rinaldi MG, Winn RE (1986) Emerging agents of phaeohyphomycosis: pathogenic species of *Bipolaris* and *Exserohilum*. *J Clin Microbiol* 24 (2): 250-259.
- McGinnis MR, Campbell G, Gourley WK, Lucia HL (1992) Phaeohyphomycosis caused by *Bipolaris spicifera*: an informative case. *Eur J Epidemiol* 8: 383-386.
- McGinnis MR, Pasarell L (1998a) In vitro testing of susceptibilities of filamentous Ascomycetes to voriconazole, itraconazole, and amphotericin B, with consideration of phylogenetic implications. *J Clin Microbiol* 36 (8): 2353-2355.
- McGinnis MR, Pasarell L, Sutton DA, Fothergill AW, Cooper CR, Rinaldi MG (1998b) In vitro activity of voriconazole against selected fungi. *Med Mycol* 36: 239-242.
- Michalak K, Michalak M, Wicha J (2005) Studies towards the total synthesis of di- and sesterterpenes with dicyclopenta (a,d) cyclooctane skeletons. Three-component approach to the A/B rings building block. *Molecules* 10: 1084-1100.
- Moore ML, Collins GR, Hawk BJ, Russell TS (2001) Disseminated *Bipolaris spicifera* in a neonate. *J Perinatol* 21: 399-401.
- Mothlag S, Anvari M (2010) Genetic variation in a population of *Bipolaris oryzae* based on RAPD-PCR in north of Iran. *Afr J Biotechnol* 9 (36): 5800-5804.
- Nakajima H, Toratsu T, Fujii Y, Ichinoe M, Hamasaki T (1998) Biosynthesis of sorokinianin a phytotoxin of *Bipolaris sorokiniana*: Evidence of mixed origin from the sesquiterpene and TCA pathways. *Tetrahedron Lett* 39: 1013-1016.
- Nakamura M, Ishibashi K (1958) On the new antibiotic „ophiobolin” produced by *Ophiobolus miyabeanus*. *J Agric Chem Soc Jpn* 32: 732-744.
- Nayak N, Satpathy G, Prasad S, Vajpayee RB, Pandey RM (2010) Correlation of proteinase production with amphotericin B resistance in fungi with mycotic keratitis. *Ophthalmic Res* 44: 113-118.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (2002) Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi, Approved Standard, Document M38-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, PA.
- Nelson RR (1964) The perfect stage of *Helminthosporium spiciferum*. *Mycologia* 56: 196-201.
- Newell CK, Steinmetz RL, Brooks HL (2006) Chronic postoperative endophthalmitis caused by *Bipolaris australiensis*. *Retina* 26 (1): 109-110.

- Nisikado Y (1929) Studies on the Helminthosporium diseases of Gramineae in Japan. *Berichte des Ohara Instituts fur Landwirtschaftliche Biologie*, Okayama Universitat. Kracshiki.4: 111-116.
- Nosanchuk JD (2006) Current status and future of antifungal therapy for systemic mycoses. *Recent Patents Anti-Infect Drug Disc* 1: 75–84.
- Nozoe S, Hirai K, Tsuda K (1966) The structure of zizannin-A and B, C₂₅-terpenoids isolated from *Helminthosporium zizaniae*. *Tetrahedron Lett* (20): 2211-2216.
- Nozoe S, Morisaki M, Fukushima K, Okuda S (1968) The isolation of an C₂₅-isoprenoid alcohol, geranylnerolidol, and a new ophiobolin. *Tetrahedron Lett* 9 (42): 4457-4458.
- Nyilasi I, Kocsubé S, Krizsán K, Galgóczy L, Pesti M, Papp T, Vágvölgyi Cs (2010) *In vitro* synergistic interactions of the effects of various statins and azoles against some clinically important fungi. *FEMS Microbiol Lett* 307: 175–184.
- O'Donnell K, Cigelnik E (1997) Two different intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Mol Phylogenet Evol* 7: 103-116.
- Olbe M, Sommarin M, Gustafsson M, Lundborg T (1995) Effect of the fungal pathogen *Bipolaris sorokiniana* toxin prehelminthosporol on barley root plasma membrane vesicles. *Plant Pathol* 44: 625-635.
- Orsenigo M (1957) Estrazione e purificazione della Cochliobolina, una tossina prodotta da *Helminthosporium oryzae*. *Phytopathology* 29: 189-196.
- Osheroov N, May GS (2001) The molecular mechanisms of conidial germination. *FEMS Microbiol Lett* 199: 153-160.
- del Palacio A, Perez-Simon M, Arribi A, Valle A, Perea S, Rodriguez-Noriega A (1997) *Bipolaris australiensis* in a Spanish patient with allergic chronic sinusitis. *Rev Iberoam Micol* 14: 191-193.
- Pasarell L, McGinnis MR, Standard PG (1990) Differentiation of medically important isolates of *Bipolaris* and *Exserohilum* with Exoantigens. *J Clin Microbiol* 28 (7): 1655-1657.
- Persoon CH (1822) *Mycologia europea*. Sectio prima. Erlangen.
- Pfaller MA, Messer SA, Hollis RJ, Jones RN (2002) Antifungal activities of posaconazole, ravuconazole, and voriconazole compared to those of itraconazole and amphotericin B against 239 clinical isolates of *Aspergillus* spp. and other filamentous fungi: Report from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2000. *Antimicrob Agents Ch* 46 (4): 1032-1037.

- Poloni A, Pessi IS, Frazzon APG, Van Der Sand ST (2009) Morphology, physiology and virulence of *Bipolaris sorokiniana* isolates. *Curr Microbiol* 59: 267–273.
- Posada D, Crandall KA (1998) MODELTEST: Testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817-818.
- Pradhan L, Sharma S, Nalamada S, Sahu SK, Das S, Garg P (2011) Natamycin in the treatment of keratomycosis: Correlation of treatment outcome and *in vitro* susceptibility of fungal isolates. *Indian J Ophtalmol* 59 (6): 512-514.
- Prajna NV, John RK, Nirmalan PK (2003) A randomised clinical trial comparing 2% econazole and 5% natamycin for the treatment of fungal keratitis. *Br J Ophthalmol* 87: 1235–1237.
- Price MF, Wilkinson ID, Gently LO (1982) Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia* 20: 7-14.
- Qiao J, Kontoyiannis DP, Wan Z, Li R, Liu W (2007) Antifungal activity of statins against *Aspergillus* species. *Med Mycol* 45: 589-593.
- Ramsdale M (2006) Programmed cell death and apoptosis in fungi. In: *The Mycota Vol. 13, Fungal Genomics* (Brown AJP, ed.), pp 113-145. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- Rehner SA (2001) Primers for Elongation Factor 1- α (EF1- α). <http://ocid.nacse.org/research/deephyphae/EF1primer.pdf>.
- Revankar SG, Patterson JE, Sutton DA, Pullen R, Rinaldi MG (2002) Disseminated phaeohyphomycosis review of an emerging mycosis. *Clin Infect Dis* 34: 467-476.
- Rex JH, Pfaller MA, Walsh TJ, Chaturvedi V, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, Gosey LL, Odds FC, Rinaldi MG, Sheehan DJ, Warnock DW (2001) Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. *Clin Microbiol Rev* 14 (4): 643-658.
- Rhodes JC (1995) *Aspergillus* proteinases and their interactions with host tissues. *Can J Bot* 73 (1): 1126-1131.
- Riess (1854) *Hedwigia* 1: 27.
- Rinaldi MG, Phillips P, Schwartz JG, Winn RE, Holt GR, Shagets FW, Elrod J, Nishioka G, Aufdemorte TB (1987) Human *Curvularia* infections. Report of five cases and review of the literature. *Diagn Microbiol Infect Dis* 6: 27-39.
- Roshan U, Livesay DR (2006) Probalign: multiple sequence alignment using partition function posterior probabilities. *Bioinformatics*, 22 (22): 2715-2721.
- Roze LV, Linz JE (1998) Lovastatin triggers an apoptosis-like cell death process in the fungus *Mucor racemosus*. *Fungal Genet Biol* 25: 119-133.

- Sabatelli F, Patel R, Mann PA (2006) *In vitro* activities of posaconazole, fluconazole, itraconazole, voriconazole, and amphotericin B against a large collection of clinically important moulds and yeasts. *Antimicrob Agents Ch* 50: 2009-2015.
- Saber WIA, El-Metwally MM, El-Hersh MS (2010) Keratinase production and biodegradation of some keratinous wastes by *Alternaria tenuissima* and *Aspergillus nidulans*. *Res J Microbiol* 5 (1): 21-35.
- Saenz RE, Brown WD, Sanders CV (2001) Allergic bronchopulmonary disease caused by *Bipolaris hawaiiensis* presenting as a necrotizing pneumonia: case report and review of literature. *Am J Med Sci* 321 (3): 209-212.
- Saha R, Das S (2005) *Bipolaris* keratomycosis. *Mycoses* 48 (6): 453-455.
- Saubolle MA, Sutton J (1996) The dematiaceous fungal genus *Bipolaris* and its role in human disease. *Clin Microbiol Newslett* 18 (1): 1-6.
- Schachter, M. (2004) Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. *Fund Clin Pharmacol* 19: 117–125.
- Schaller M, Borelli C, Korting HC, Hube B (2005) Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses* 48: 365-377.
- Schell WA (2002) Dematiaceous Hyphomycetes. In: Pathogenic Fungi in Humans and Animals. Howard DH, CRC Press pp 565-637.
- Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Chen W, Fungal Barcoding Consortium (2012) Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc Natl Acad Sci USA* 109 (16): 6241-6246.
- Schubert MS, Goetz DW (1998) Evaluation and treatment of allergic fungal sinusitis. I. Demographics and diagnosis. *J Allergy Clin Immun* 102 (3): 387-394.
- Schubert MS (2009) Allergic fungal sinusitis: pathophysiology, diagnosis and management. *Med Mycol* 47 (1): 324-330.
- Schwarz P, Lortholary O, Dromar F, Dannaoui E (2007) Carbon assimilation profiles as a tool for identification of Zygomycetes. *J Clin Microbiol* 45 (5): 1433-1439.
- Sharon A, Finkelstein A, Shlezinger N, Hatam I (2009) Fungal apoptosis: function, genes and gene function. *FEMS Microbiol Rev* 33: 833–854.
- Shamsi S, Yasmin Z (2009) *Bipolaris australiensis* (M.B. Ellis) Tsuda & Ueyama – A new dematiaceous hyphomycetes record for Bangladesh. *J Plant Taxon* 16 (1): 91-93.

- Shen X, Krasnoff SB, Lu SW, Dunbar CD, O'Neal J, Turgeon BG, Yoder OC, Gibson DM, Hamann MT (1999) Characterization of 6-epi-3-anhydrophiobolin B from *Cochliobolus heterostrophus*. *J Nat Prod* 62 (6): 895-897.
- Shimizu K, Tanaka C, Peng Y-L, Tsuda M (1998) Phylogeny of *Bipolaris* inferred from nucleotide sequences of *Brn1*, a reductase gene involved in melanin biosynthesis. *J Gen Appl Microbiol* 44: 251-258.
- Shin EJ, Guertler N, Kim E, Lalwani AK (2003) Screening of middle ear effusion for the common sinus pathogen *Bipolaris*. *Eur Arch Oto-rhino-l* 260: 78-80.
- Shoemaker RA (1959) Nomenclature of *Drechslera* and *Bipolaris*, grass parasites segregated from 'Helminthosporium'. *Can J Bot* 37: 879-887.
- Shotwell OL, Ellis JJ (1976) *Helminthosporium*, *Drechslera*, and *Bipolaris* toxins. *Adv Chem Ser* 149: 318-343.
- Shukla PK, Kumar M, Keshava GBS (2008) Mycotic keratitis: an overview of diagnosis and therapy. *Mycoses* 51: 183-199.
- da Silva Barros ME, de Assis Santos D, Soares Hamdan J (2009) Evaluation of susceptibility of *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum* clinical isolates to antifungal drugs using a modified CLSI microdilution method (M38-A). *J Med Microbiol* 56 (4): 514-518.
- Silveira F, Nucci M (2001) Emergence of black moulds in fungal disease: epidemiology and therapy. *Curr Opin Infect Dis* 14: 679-684.
- Sivanesan A (1987) Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and their teleomorphs. In: CAB International Mycological Papers, International Mycological Institute, CAB International 158: 1-261.
- Singh SB, Smith JL, Sabnis GS, Dombrowski AW, Schaeffer JM, Goetz MA, Bills GF (1991) Structure and conformation of ophiobolin K and 6-epiophiobolin K from *Aspergillus ustus* as a nematocidal agent. *Tetrahedron* 47 (34): 6931-6938.
- Singh SB, Jayasuriya H, Dewey R, Polishook JD, Dombrowski AW, Zink DL, Guan Z, Collado J, Platas G, Pelaez F, Felock PJ, Hazuda DJ (2003) Isolation, structure, and HIV-1-integrase inhibitory activity of structurally diverse fungal metabolites. *J Ind Microbiol Biotechnol* 30: 721-731.
- Song JL, Lyons CN, Holleman S, Oliver BG, White TC (2003) Antifungal activity of fluconazole in combination with lovastatin and their effects on gene expression in the ergosterol and prenylation pathways in *Candida albicans*. *Med Mycol* 41: 417-425.

- de Souza TP, Scroferneker ML, da Costa JM, Carissimi M, Corbellini VA (2008) Secretion of five extracellular enzymes by strains of chromoblastomycosis agents. *Rev I Med Trop* 50 (5): 269-272.
- Srinivasan M (2004) Fungal keratitis. *Curr Opin Ophthalmol* 15: 321–327.
- Staden R, Judge DP, Bonfield JK (2001) Sequence assembly and finishing methods. In: Bioinformatics. *A practical guide to the analysis of genes and proteins*. Baxevanis AD Francis Ouellette BF, Wiley-Interscience.
- Stancu C, Sima A (2001) Statins: mechanism of action and effects. *J Cell Mol Med* 5 (4): 378-387
- Straka BF, Cooper PH, Body BA (1989) Cutaneous *Bipolaris spicifera* infection. *Arch Dermatol* 125: 1383-1386.
- Stehr F, Kretschmahr M, Kröger C, Hube C, Schäfer W (2003) Microbial lipases as virulence factors. *J Mol Catal B-Enzym* 22: 347-355.
- Subramanian CV (1956) Hyphomycetes-II. *Indian Bot Soc* 35: 446–494.
- Subramanian CV, Jain BL (1966) A revision of some graminicolous *Helminthosporia*. *Curr Sci India* 35: 352–355.
- Sun QN, Fothergill AW, McCarthy DI, Rinaldi MG, Graybill JR (2002) In vitro activities of posaconazole, itraconazole, voriconazole, amphotericin B, and fluconazole against 37 clinical isolates of zygomycetes. *Antimicrob Agents Chemoth* 46: 1581–1582.
- Sutton DA, Sanche SE, Revankar SG, Fothergill AW, Rinaldi MG (1999) In vitro amphotericin B resistance in clinical isolates of *Aspergillus terreus*, with a head-to-head comparison to voriconazole. *J Clin Microbiol* 37: 2343–2345.
- Tessari G, Forni A, Ferretto R, Solbiati M, Faggian G, Mazzucco A, Barba A (2003) Lethal systemic dissemination from a cutaneous infection due to *Curvularia lunata* in a heart transplant recipient. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 17(4): 440-442.
- Thomas PA (1994) Mycotic keratitis - an underestimated mycosis. *J Med Vet Mycol* 32: 235-256.
- Thomas PA (2003) Fungal infections of the cornea. *Eye* 17: 852–862.
- Tomee JF, Kauffman HF (2000) Putative virulence factors of *Aspergillus fumigatus*. *Clin Exp Allergy* 30: 476–484.
- Torres C, Ro JY (1996) Allergic fungal sinusitis: A clinicopathologic study of 16 cases. *Hum Pathol* 27 (8): 793-799.
- Toul P, Castillo L, Hofman V, Bouchara J-P, Chanalet S, Gari-toussant M (2006) A pseudo tumoral sinusitis caused by *Bipolaris* sp. *J Infection* 53: 235-237.

- Tsipouras A, Adefarati AA, Tkacz Tsipouras A, Adefarati AA, Tkacz JS, Frazier EG, Rohrer SP, Birzin E, Rosegay A, Zink DL, Goetz MA, Singh SB, Schaeffer JM (1996) Ophiobolin M and analogues, noncompetitive inhibitors of ivermectin binding with nematocidal activity. *Bioorg Med Chem* 4: 531-536.
- Tsuda M, Ueyama A, Nishihara N (1977) *Pseudocochliobolus nisikadoi*, the perfect state of *Helminthosporium coicis*. *Mycol Soc Am* 69 (6): 1109-1120.
- Tsuda M, Ueyama A (1981) *Pseudocochliobolus australiensis*, the ascigerous state of *Bipolaris australiensis*. *Mycologia* 73: 88-96.
- Vastag M, Papp T, Kasza Zs, Vágvölgyi Cs (1998) Differentiation of *Rhizomucor* species by carbon source utilization and isoenzyme analysis. *J Clin Microbiol* 36 (7): 2153-2156.
- Vágvölgyi Cs, Magyar K, Papp T, Palágyi Zs, Ferenczy L, Nagy Á. (1996) Value of substrate utilization data for characterization of *Mucor* isolates. *Can J Microbiol* 42: 613-615.
- Venugopal PV, Venugopal TV, Ramakrishna ES, Ilavarasi S (1993) Antimycotic susceptibility testing of agents of black grain eumycetoma. *J Med Vet Mycol* 31 (2): 161-164.
- Venugopal PV, Venugopal TV (1995) Disk diffusion susceptibility testing of dermatophytes with imidazoles. *Indian J Pathol Microbiol* 38 (4): 369-374.
- Vilgalys R, Hester M (1990) Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *J Bacteriol* 172: 4238-4246.
- Viola GM, Sutton R (2010) Allergic fungal sinusitis complicated by fungal brain mass. *Int J Infect Dis* 14: 299-301.
- Walsh TJ, Groll A, Hiemenz J, Flemming R, Roilides E, Anaissie E (2004) Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. *Clin Microbiol Infect* 10 (1): 48-66.
- Walton JD (1996) Host-selective toxins: agents of compatibility. *Plant Cell* 8: 1723-1733.
- Walton JD (2006) Molecules of interest: HC-toxin. *Phytochemistry* 67: 1406-1413.
- Wei H, Itoh T, Kinoshita M, Nakai Y, Kurotakib M, Kobayashi M (2004) Cytotoxic sesterterpenes, 6-epi-ophiobolin G and 6-epi-ophiobolin N, from marine derived fungus *Emericella variegata* GF10. *Tetrahedron* 60: 6015-6019.
- Weikert-Oliveira RCB, De Resende MA, Valério H, Caligiorne RB, Paiva E (2002) Genetic variation among pathogens causing „*Helminthosporium*” disease of rice, maize and wheat. *Fitopatol Bra* 27 (6): 639-643.

- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, Academic Press pp 315-322.
- Wilhelmus KR, Jones DB (2001) *Curvularia* keratitis. *Tr Am Ophth Soc* 99: 111-132.
- Zelter A, Bencina M, Bowman BJ, Yarden O, Read ND (2004) A comparative genomic analysis of the calcium signaling machinery in *Neurospora crassa*, *Magnaporthe grisea* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Fung Genet Biol* 41: 827-841.
- Yang T, Lu Z, Meng L, Wei S, Hong K, Zhu W, Huang C (2012) The novel agent ophiobolin O induces apoptosis and cell cycle arrest of MCF-7 cells through activation of MAPK signaling pathways. *Bioorg Med Chem Lett* 22(1): 579-585.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Az Ascomycota törzs, Pleosporales rendjébe sorolt *Cochliobolus* nemzetség tagjai elsősorban talajból és fűfélékről izolálható, melanizált hifákkal rendelkező fonalasgombák. A növényi kórokozóként ismert gombák számos, változatos szerkezetű másodlagos metabolit termelésére képesek. A *Cochliobolus* nemzetség anamorf alakjait a *Bipolaris* és a *Curvularia* nemzetségekbe sorolják. Egyes fajok, mint a *Bipolaris australiensis*, *B. hawaiiensis*, *B. spicifera*, illetve a *Curvularia lunata*, *Cu. brachyspora* és *Cu. senegaliensis*, gyakran izolálhatók féohifomikózisokból (olyan gombás megbetegedésekből, melyeket melanin termelő fonalas gombák okoznak), emellett jelentős kórokozói a gombák által kiváltott allergiás tünetekkel járó orrmelléküreg-gyulladásnak és szaruhártyafekélynek. Gombaellenes szerekkel szembeni érzékenységgükkel kapcsolatban általánosan elmondható, hogy az amfotericin B általában magas dózisban hatásos ellenük, itrakonazollal szemben viszont általában érzékenyek.

A *Cochliobolus* nemzetség tagjai aszkospórájuk morfológiája alapján könnyen elkülöníthetők a Pleosporaceae család többi tagjától, míg a *Bipolaris* és *Curvularia* nemzetségek a konídiumok alakja alapján különböztethetők meg. Azonban számos faj, köztük a *B. australiensis* és a *B. spicifera*, a határozásban alkalmazott konídiumméret, morfológia és szeptáltság, illetve az ITS régió szekvenciájának vizsgálata alapján sem azonosítható egyértelműen.

A *Cochliobolus*, *Bipolaris* és *Curvularia* nemzetségek rendszertanát az ITS régió, *gpd* és *Brn1* szekvenciák alapján készített filogenetikai tanulmányokban vizsgálták, melyek alapján a *Cochliobolus* nemzetség két jól körülhatárolt csoportra osztható. A *Cochliobolus* 1 csoport kizárólag növénypatogén, tipikus hajlott konídiummal rendelkező *Bipolaris*okat tartalmaz, míg a *Cochliobolus* 2 csoport foglalja magába a nem tipikus konídium alakkal rendelkező *Bipolaris* és *Curvularia* fajokat, valamint az általunk is vizsgált humán kórokozó *B. australiensis*, *B. hawaiiensis* és *B. spiciferat*. A *Bipolaris* nemzetség humán fertőzésekből izolált tagjai esetén nem készült a fertőzés szempontjából jelentős extracelluláris enzimtermelés, illetve esetlegesen a fajazonosítást megkönnyítő, szénasszimilációs spektrum felvételét célzó tanulmány.

A kutatás célkitűzései a következők voltak:

1. A humán kórokozó *Cochliobolus* fajok azonosításában használt morfológiai markerek vizsgálata.

2. A humán keratomikózisból származó *Bipolaris*ok megkülönböztetésére alkalmas molekuláris markerek azonosítása.
3. A klinikai mintákból származó *Bipolaris* törzsek filogenetikai analízise
4. A humán kórokozó *Cochliobolus* izolátumok szénforrás-hasznosítási spektruma.
5. A humán keratomikózisból származó *Cochliobolus* izolátumok extracelluláris enzimtermelésének vizsgálata.
6. A *Cochliobolus* izolátumok antifungális szerekkel szembeni érzékenysége.
7. Antifungális hatású vegyületek kombinációinak vizsgálata *Cochliobolus* izolátumokkal szemben.
8. A *Bipolaris* nemzetség tagjai által termelt ophiobolinok antimikrobiális hatásának vizsgálata.

Eredményeink:

1. A humán kórokozó *Cochliobolus* fajok azonosításában használt morfológiai markerek vizsgálata.

Felülvizsgáltuk a klinikai mintákból származó *Bipolaris* fajok azonosítása során használt morfológiai markerek (konídiumalak, -hossz, -szélesség és -szeptumszám) használhatóságát humán keratomikózisból és törzsgyűjteményből származó törzseken. Eredményeinket összevetettük az azonosítás alapjául szolgáló, a klinikai *Bipolaris*ok azonosításával foglalkozó más tanulmányokban rögzített értékekkel. Az általunk vizsgált izolátumok esetén a *Curvularia* nemzetség tagjai a konídium morfológia, a *B. hawaiiensis* izolátumok pedig a konídiumok mérete alapján megkülönböztethetők a többi fajtól, azonban a *B. australiensis* és *B. spicifera* törzsek sem a konídium mérete és alakja, sem a válaszfalak száma alapján nem különíthetők el egymástól.

2. A humán keratomikózisból származó *Bipolaris*ok megkülönböztetésére alkalmas molekuláris markerek azonosítása.

Megvizsgáltuk humán keratomikózisból és törzsgyűjteményből származó *B. australiensis*, *B. hawaiiensis* és *B. spicifera* fajok nukleotidszekvencia alapú azonosításának lehetőségeit is. Jelenleg a klinikai gyakorlatban a morfológiai vizsgálatok megerősítésére használt ITS régió esetén nem tudtunk mindhárom fajt elkülönítő, differenciáló karaktereket azonosítani, mivel a klinikai azonosításban alkalmazott hasonlóság alapú keresés során 98-100%-os egyezést kapunk az opportunistá patogén *Bipolaris* fajokon kívül más, távolabbi rokon fajokkal is. Ezért célul tűztük ki a fajok pontos elkülönítésére alkalmas molekuláris karakterek azonosítását. Ennek érdekében vizsgáltuk a kalmodulin (*cmd*), transzlációs elongációs faktor 1 α (*tef*), tubulin (*tub*) és az rDNS intergénikus régiójának szakaszait (IGS).

A vizsgálatokban a *B. australiensis*, *B. hawaiiensis* és *B. spicifera* típus törzseket jelöltük ki referenciatörzseknek, melyek alapján meghatároztuk a fajra jellemző eltéréseket. Az azonosított, fajspecifikus eltérést mutató helyeket, a keratomikózisból származó izolátumokon, illetve ahol rendelkezésre állt, génbanki szekvenciákon is teszteltük. Ezek alapján megállapítottuk, hogy a *cmd* és a *tef* szekvenciák nem hordoztak mindhárom faj azonosítására alkalmas motívumot, ezzel szemben az IGS régióban számos, mindhárom fajra jellemző, megkülönböztető karaktert azonosítottunk. Ezért a humán kórokozó *Bipolaris* fajok azonosítására az IGS régiót javasoljuk a referencia törzsek IGS szekvenciájában meghatározott karakterek alapján.

A RAPD analízis használata is felvetődött a fajok elkülönítése során, melyben szintén sikerült a fajokra jellemző mintázatok azonosítani.

3. A klinikai mintákból származó *Bipolaris* törzsek filogenetikai analízise

A *B. australiensis* és *B. spicifera* fajok morfológiai és molekuláris hasonlóságait látva, felvetődött a kérdés, hogy esetükben ténylegesen beszélhetünk-e két különálló fajról. Ennek eldöntése érdekében filogenetikai módszerekkel vizsgáltuk a *B. australiensis*, *B. hawaiiensis* és *B. spicifera* fajok rokoni kapcsolatait. Az ITS, *tef* és RAPD molekuláris mintázaton alapuló elemzés eredményeként többségében alacsony támogatottságú, politómiával terhelt filogramokat kaptunk. A legjobb eredményt az ITS + *tef* + *tub* + RAPD + IGS kombinált adatmátrix Bayes-féle elemzése során kaptuk, melyben a dichotómikus elágazásokat hordozó filogramon, a *Curvularia*, *B. hawaiiensis*, *B. australiensis* és *B. spicifera* izolátumok is jól elkülönülő csoportokat alkottak. Bár a filogramon két elkülönülő csoportot alkottak a *B. australiensis* és a *B. spicifera* izolátumok, a morfológiai és fajspecifikus molekuláris karakterek vizsgálatának eredményei is arra engednek következtetni, hogy esetükben feltehetően egy faj két változatáról lehet szó.

4. A humán kórokozó *Cochliobolus* izolátumok szénforráshasznosítási spektruma.

Munkánk során meghatároztuk a fiziológiai szempontból kevésbé jellemzett, humán keratomikózisokból izolált *Bipolaris* és *Curvularia* törzsek, illetve törzsgyűjteményi izolátumok szénforráshasznosítási spektrumát, illetve a vegyületek okozta morfológiai és fiziológiai eltéréseket. A tesztelt vegyületeket az egyes izolátumok nagyon eltérően hasznosították, filogenetikailag hasznos információt nem kaptunk a vizsgálatból.

5. A humán keratomikózisból származó *Cochliobolus* izolátumok extracelluláris enzim termelésének vizsgálata.

Megvizsgáltuk a humán keratomikózisból és törzsgyűjteményből származó *Cochliobolus* izolátumok extracelluláris elasztáz, foszfolipáz, keratináz, lipáz és proteáz

termelésének képességét. Az izolátumok mindegyike képes volt elasztáz és lipáz termelésére, melyeknek fontos szerepe lehet a fertőzés kialakításában. Foszfolipázt és proteázt csak néhány izolátum termelt, míg keratinolitikus aktivitást egy izolátumnál sem tudtunk kimutatni.

6. A *Cochliobolus* izolátumok antifungális szerekekkel szembeni érzékenysége.

Meghatároztuk az AMB, NAT, ECO, FLU, ITR, KET, CLZ, MCZ és TRB MIC értékét a humán keratomikózisból és törzsgyűjteményből származó *B. australiensis*, *B. hawaiiensis* és *B. spicifera* izolátumokkal szemben. A legszélesebb körben alkalmazott AMB általában csak nagyon magas dózis mellett tudta gátolni a gombák növekedését, azonban az ITR, és egyes esetekben a CLZ és KET is hatásos volt. Emellett meghatároztuk az elsősorban koleszterinszint-csökkentőként használt, de antifungális hatással is rendelkező ATO, FLV, LOV, ROS és SIM MIC értékeit is az izolátumaink esetében. Leghatásosabbnak a FLV és SIM bizonyult a vegyületek közül, de mindegyik magas, a plazmában maximálisan elérhetőnél nagyobb koncentrációban alkalmazva gátolta a gombák növekedését.

7. Antifungális hatású vegyületek kombinációinak vizsgálata *Cochliobolus* izolátumokkal szemben.

Teszteltük az AMB-sztatin, illetve FLU-, ITR-, KET- és MCZ-sztatin kombinációkat hat választott izolátummal szemben. A leghatásosabbak az AMB-sztatin és FLU-sztatin kombinációk voltak. Szinergizmust ritkán, additív kölcsönhatást többször tapasztaltunk a FIC index és Abbott-formula alapján is, bár számos esetben a szinergizmushoz nagyon közeli értékekkel. Antagonizmust egy esetben sem tapasztaltunk.

8. A *Bipolaris* nemzetség tagjai által termelt ophiobolinok antimikrobiális hatásának vizsgálata.

Meghatároztuk a gombacsoportra jellemző és kis mennyiségben az opportunistáknak humánpatogének fermentlevéből is kimutatható ophiobolin A és B antifungális hatását a napjainkban használt gombaellenes szerek nagy részével szemben rezisztens járomspórás gombákkal szemben. Az ophiobolin A 3,125-12,5 µg/ml koncentrációtartományban, míg az ophiobolin B 25-50 µg/ml koncentrációtartományban gátolta a *Gilbertella*, *Micromucor*, *Mucor*, *Rhizomucor* és *Rhizopus* izolátumok növekedését. A *Mucor* és *Rhizopus* izolátumoknál az ophiobolin A hatására bekövetkező abnormális hifamorfológiát, plazmakiáramlást, elágazó, sokszor szegmentált csíratömlőképzést figyeltünk meg. Az ophiobolin A hatását APOAF apoptózis detektáló kit és DAPI festéssel vizsgálva megállapítottuk, hogy a vegyület apoptotikus jellegű folyamatok beindításával gátolja a gombák növekedését.

8. SUMMARY

Members of the genus *Cochliobolus* belong to the ascomycetous order *Pleosporales* and can be isolated from graminiculous hosts and grasses. These melanized fungi are able to produce several types of secondary metabolites, which have important roles in the infections of plants. Asexual stages of the genus *Cochliobolus* are placed in the two anamorphic genera *Bipolaris* and *Curvularia*.

The species *B. australiensis*, *B. hawaiiensis*, *B. spicifera*, *Cu. lunata*, *Cu. brachyspora* and *Cu. senegaliensis* can be frequently isolated from phaeohyphomycosis, which is the summarizing name of the infections caused by melanized fungi. Furthermore, these fungi are the most important causative agents of the allergic fungal sinusitis and, after *Aspergillus* and *Fusarium* spp., are the third most frequent causing agents of keratomycoses. The species are common in the tropical and subtropical regions of the world, but due to the climatic changes, they are emerging in other regions too.

Among the members of the family Pleosporaceae, the genus *Cochliobolus* can be easily differentiated based on the ascospores, while the genera *Bipolaris* and *Curvularia* can be identified based on the conidial morphology. The species *B. australiensis* and *B. spicifera* are very difficult to distinguish both on the basis of the currently used morphological markers (such as the length and width of the conidia and the number of septa) and via the sequencing of the ITS region.

The taxonomy of the genera *Cochliobolus*, *Bipolaris* and *Curvularia* was examined in detail by the sequence analysis of the ITS region and the *gpd* and *Brn1* genes. The genus *Cochliobolus* could be separated into two groups. The *Cochliobolus* group 1 contains the highly virulent phytopathogenic *Bipolaris* species with typical, large canoe-shaped conidia, while the *Cochliobolus* group 2 is formed by *Bipolaris* species producing atypical, little or medium-sized, fusiform-shaped conidia and the *Curvularia* species together. This *Cochliobolus* group 2 also contains the studied *B. australiensis*, *B. hawaiiensis* and *B. spicifera* species. These opportunistic pathogenic species are poorly characterized from the aspects of extracellular enzyme production, which may be important in pathogenesis, and the carbon assimilation or antifungal susceptibility spectra.

Aims of the study:

1. Investigation of the morphological markers used in the species identification of the genera *Bipolaris* and *Curvularia*.

2. Identification of molecular markers for the differentiation of the human pathogenic *Bipolaris* species
3. Phylogenetic analysis
4. Carbon source assimilation of the human pathogenic *Cochliobolus* isolates
5. Extracellular enzyme production of the human pathogenic *Cochliobolus* isolates
6. Antifungal susceptibility of the *Cochliobolus* isolates
7. Inhibitory effect of antifungals combined with statins against *Cochliobolus* isolates
8. Antifungal effects of ophiobolins produced by *Bipolaris* spp.

Results of the study:

1. Investigation of the morphological markers used in the species identification of the genera *Bipolaris* and *Curvularia*.

Morphological characters currently used in the species identification, such as the shape, length and width of the conidia and number of the conidial septa were re-examined in the isolates derived from human keratomycoses and obtained from culture collections (CBS, BRIP). The isolates of *Curvularia* sp. could be easily differentiated from the *Bipolaris* species based on their different conidial morphology, while the isolates of *B. hawaiiensis* could be identified by the size of the conidia. We did not find any morphological feature that clearly discerns *B. australiensis* and *B. spicifera* from each other. It is similar to the results of McGinnis (1986), who made the most comprehensive study of the human pathogenic *Bipolaris* species.

2. Identification of molecular markers for the differentiation of the human pathogenic *Bipolaris* species

Sequence-based identification of the species *B. australiensis*, *B. hawaiiensis* and *B. spicifera* was also examined. Currently the ITS region is used to verify the morphology-based identification of these fungi. However, we did not find any sequence motif that is able to clearly differentiate the three investigated species. Moreover, similarity searches performed in international sequence databases using the ITS region gave 98-100% identity for *B. australiensis*, *B. hawaiiensis* and *B. spicifera*, as well as many other *Bipolaris* species. Therefore, additional sequences, such as calmodulin (*cmd*), translational elongation factor 1 α (*tef*), tubulin (*tub*) and the intergenic spacer of the rDNA (IGS) were also involved in the analysis. The type strains of *B. australiensis*, *B. hawaiiensis* and *B. spicifera* were used as reference strains during the investigations. The proposed marker motifs were identified in an alignment of the reference strains at first, then, they were tested in larger alignments of strains from keratomycoses and other sources. On the basis of *cmd* and *tef*, the three *Bipolaris*

species could not be differentiated, while the IGS region contained a numerous motifs and nucleotide positions useful for the identification of the species. We suggest sequencing of the IGS region for the differentiation of *B. australiensis*, *B. hawaiiensis* and *B. spicifera* isolates. RAPD analysis was also performed to test it as a possible method for species identification and reproducible species-specific amplification patterns could be established with certain primers.

3. Phylogenetic analysis

Because of the morphological and molecular similarity of *B. australiensis* and *B. spicifera*, it was questioned that they are really different species. Therefore, a phylogenetic analysis was performed based on the nucleotide sequence of the ITS region, the *tef* gene and the RAPD data (alone and in combinations) using the Bayes-algorithm, but the phylograms showed high amount of politomy and low posterior probability. Therefore the ITS + *tef* + *tub* + RAPD + IGS sequences were combined into a data matrix, which was analysed using the Bayes-method. On the estimated phylogeny, the isolates of *Curvularia* sp., *B. hawaiiensis*, *B. australiensis* and *B. spicifera* grouped to four distinct clades. Although *B. australiensis* and *B. spicifera* can be separated on this phylogram, the question, whether they are two distinct species or only two varieties of the same species, remained unresolved.

4. Carbon source assimilation of the human pathogenic *Cochliobolus* isolates

The carbon source assimilation spectra of 64 *Bipolaris* and *Curvularia* isolates from human kertyomycosis and culture collections were investigated and the morphological and physiological changes were also recorded. The isolates showed great intraspecific variability in the usage of the compounds. Only galactose proved to be useful in species identification. Generally, the carbon assimilation spectra bear only limited phylogenetic information.

5. Extracellular enzyme production of the human pathogenic *Cochliobolus* isolates

The extracellular elastase, phospholipase, keratinase, lipase and proteinase production of the isolates from human keratomyomycosis were investigated. All of the isolates produced elastase and lipase, the possible role of which in the pathogenesis can be suggested. Some isolates were able to produce phospholipase and proteinase enzymes as well and none of them showed keratinase production.

6. Antifungal susceptibility of the *Cochliobolus* isolates

The minimal inhibitory concentration of amphoterycin B (AMB), natamycin, clotrimazole (CLZ), econazole, fluconazole (FLZ), itraconazole (ITR), ketoconazole (KET), miconazole (MCZ) and terbinafine was determined against the involved *Bipolaris* and *Curvularia* isolates. The most effective drug was ITR and, in some cases, CLZ and KET

proved to be effective against the isolates. Majority of the strains proved to be highly insensitive to AMB. Minimal inhibitory concentrations of atorvastatin, fluvastatin (FLV), lovastatin, rosuvastatin and simvastatin (SIM) were also determined. These drugs are primarily used as cholesterol-lowering agents, but they also have some antifungal effects. FLV and SIM were the most effective against *Bipolaris* and *Curvularia*, but all of the statins were effective only in a concentration above of the achievable value in the plasma.

7. Inhibitory effect of antifungals combined with statins against *Cochliobolus* isolates

Combinations of statins with AMB, FLZ, ITR, KET and MCZ were tested against six different *Bipolaris* isolates. The interaction types were determined both with the FIC index and the Abbott-formula. Most of the interactions were additive, but in some cases synergism could also be observed, while antagonism was not detected. Several additive interactions were very close to synergism.

8. Antifungal effects of ophiobolins produced by *Bipolaris* spp.

Ophiobolins are sesterterpene-type secondary metabolites of *Bipolaris* species; they can be extracted from the media of the human pathogenic species as well. We investigated their antifungal effects against several zygomycetous fungi, which are known to be resistant to the majority of the currently used antifungal agents. Against isolates of *Gilbertella*, *Micromucor*, *Mucor*, *Rhizomucor* and *Rhizopus*, ophiobolin A and B proved to be effective in the ranges of 3.125-12.5 µg/ml and 25-50 µg/ml, respectively. In addition, aberrations in the germ tubes and hyphal development were observed due to the ophiobolin A treatment. Swollen and segmented hyphal elements, as well as plasma extrusions were also detected. Microscopy and molecular studies revealed apoptosis-like effects of ophiobolin A in *Mucor* and *Rhizopus* strains.

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt köszönettel tartozom Prof. Dr. Vágvolgyi Csabának, hogy lehetővé tette munkámat az SZTE TTIK Mikrobiológiai Tanszékén.

Külön köszönet illeti témavezetőmet, Dr. Papp Tamást, hogy folyamatosan figyelemmel kísérte és segítette munkámat, áldozatos munkája, irányítása, tanácsai és bátorítása nagyban hozzájárultak a dolgozat elkészüléséhez.

Köszönettel tartozom Dr. Nyilasi Ildikónak, különösen a mikrodilúciós tesztekkel kapcsolatos segítségéért és tanácsaiért, illetve, hogy kutatói munkámat már szakdolgozó korom óta értékes tanácsokkal segíti. Hálával tartozom Dr. Nagy G. Lászlónak, aki nagy türelemmel és szakértelemmel segítette a filogenetikai módszerek elsajátítását és használatát. Az ophiobolinok tisztítása során nyújtott segítségéért és tanácsaiért hálával tartozom Dr. Szekeres Andrásnak és Bencsik Ottónak.

Továbbá itt szeretném megköszönni Palanisamy Manikandannak (Aravind Eye Hospital, Coimbatore, India), hogy rendelkezésünkre bocsátotta a humán keratomikózisból származó izolátumokat.

Emellett köszönöm a 309. és 312. labor minden munkatársának szakmai tanácsait és barátságukat.

10. MELLÉKLETEK

1. számú melléklet: Fajspecifikus molekuláris eltérések az *tef* (1-750), ITS (751-1138), IGS 1 (1139-2233) és IGS 2 (2234-3066) szekvenciákban, a referenciatörzsek illesztésével bemutatva. Szürke háttér jelöli a fajspecifikus eltéréseket.

Figure 1 displays the multiple sequence alignment of the 5' region of the *B. spicifera*, *B. hawaiiensis*, and *B. australiensis* genomes. The alignment shows the first 700 nucleotides of the genome for each species. The sequences are color-coded: A (green), C (blue), G (red), and T (black). The alignment is shown in a grid format with columns representing nucleotide positions (1-700) and rows representing the three species. The alignment shows a high degree of conservation between the three species, with only a few nucleotide differences observed.

Species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	4
---------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---

	710	720	730	740	750	760	770	780	790	800
SZMC 13082 <i>B.spicifera</i>	TCGGTGCCGGTTACGCACCAGTCCTTGACTGCCACACTGCTCACATTGCTCGTTCGCGGCTGGACTATTTATTACCCCTTGCTTTTGCACCTTGTTGTT									
SZMC 13085 <i>B.hawaiiensis</i>	TCGGTGCCGGTTACGCACCAGTCCTTGACTGCCACACTGCTCACATTGCTCGTTCGCGGCTGGACTATTTATTACCCCTTGCTTTTGCACCTTGTTGTT									
SZMC 13086 <i>B.australiensis</i>	TCGGTGCCGGTTACGCACCAGTCCTTGACTGCCACACTGCTCACATTGCTCGTTCGCGGCTGGACTATTTATTACCCCTTGCTTTTGCACCTTGTTGTT									

	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900
SZMC 13082 <i>B.spicifera</i>	TCCTGGGCGGGTTCGCTCGCCACCAGGACCACAAATATAAACCTTTTTTATGCAGTTGCAATCAGCGTCAGTATAACAAATGTAATCATTTACAACCTTC									
SZMC 13085 <i>B.hawaiiensis</i>	TCCTGGGCGGGTTCGCTCGCCACCAGGACCACAAATATAAACCTTTTTTATGCAGTTGCAATCAGCGTCAGTATAACAAATGTAATCATTTACAACCTTC									
SZMC 13086 <i>B.australiensis</i>	TCCTGGGCGGGTTCGCTCGCCACCAGGACCACAAATATAAACCTTTTTTATGCAGTTGCAATCAGCGTCAGTATAACAAATGTAATCATTTACAACCTTC									

	910	920	930	940	950	960	970	980	990	1000
SZMC 13082 <i>B.spicifera</i>	AACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAGTGTGAATTGCAGAAATCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGC									
SZMC 13085 <i>B.hawaiiensis</i>	AACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAGTGTGAATTGCAGAAATCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGC									
SZMC 13086 <i>B.australiensis</i>	AACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAGTGTGAATTGCAGAAATCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGC									

	1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080	1090	1100
SZMC 13082 <i>B.spicifera</i>	ACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCGTTCGAGCGTCATTTGTACCCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTTTGGTTTACATTTGGTA									
SZMC 13085 <i>B.hawaiiensis</i>	ACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCGTTCGAGCGTCATTTGTACCCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTTTGGTTTCCCCCCTA									
SZMC 13086 <i>B.australiensis</i>	ACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCGTTCGAGCGTCATTTGTACCCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTTTGGTTTCCCCCCTA									

	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200
SZMC 13082 <i>B.spicifera</i>	AAATGACCTGATTGCAACTGCATAAAAAAGGTTTAAATAGGCCCTTTGGCCAGAACCTTACCAGGCCGGCATGGGCAGTCT									
SZMC 13085 <i>B.hawaiiensis</i>	AAAAGGGGA-CTC-----GCCTTAAAA-GG-GCACCAGTCGGATACGAATAGGCCCTTTGGCCAGAACCTTACCAGGCCGGCATGGGCAGTCT									
SZMC 13086 <i>B.australiensis</i>	CAAA-GA-CTC-----GCCTTAAAA-CG-----									

	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300
SZMC 13082 <i>B.spicifera</i>	CATTGAAGTTGAGGCTGCTCGCCGGCGTATTGCAATTGTACAGTGCGCAGGATTGAATCCTTTGCAGACGACTTAGTTGCTAGCCGGGTCGTGTAAGTA									
SZMC 13085 <i>B.hawaiiensis</i>	TATTGAAGTTGGGGCTGCTCGCCGGCGTATTGCAATTGTACAGTGCGCAGGATTGAATCCTTTGCAGACGACTTAGTTGCTAGCCGGGTCGTGTAAGTA									
SZMC 13086 <i>B.australiensis</i>	-----TGGGGCTGCTCGCCGGCGTATTGCAATTGTTTT-TGCGCAGGATTGAATCCTTTGCAGACGACTTACTTGTCTAGCCGGGTCGTGTAAGTA									

	1310	1320	1330	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400
SZMC 13082 <i>B.spicifera</i>	GTCGAGTAGCCTTGTGTTACGAGCTATTGAGCGTAAGCCCGTCGCTAGCTTGGTTGAAATTGGGAATAATACCCCTCCCCGTTTGTGGAAGAGTGGCCTTC									
SZMC 13085 <i>B.hawaiiensis</i>	GTCGAGTAGCCTTGTGTTACGAGCTATTGAGCGTAAGCCCGTCGCTAGCTTGGTTGAAATTGGGAATAATACCCCTCCCCGTTTGTGGAAGAGTGGCCTTC									
SZMC 13086 <i>B.australiensis</i>	GTCGAGTAGCCTTGTGTTACGAGCTATTGAGCGTAAGCCCGTCGCTAGCTTGGTTGAAATTGGGAATAATACCCCTCCCCGTTTGTGGAAGAGTGGCCTTC									

	1410	1420	1430	1440	1450	1460	1470	1480	1490	1500
SZMC 13082 <i>B.spicifera</i>	TATTAGCCGCGGCTCAGAAGGGGAGAGAGTAGTAGTGCATGCTTTTTTGAATGGCTGCTAGTAACTTGTGATTTTTTGAACCA									
SZMC 13085 <i>B.hawaiiensis</i>	TGATAGCCGCGGCTCAGAAGGGGAGAGAGTAGTAGTGCATGCTTTTAGTAGTAAGT-----TGGAGTTGTTGGACCA									
SZMC 13086 <i>B.australiensis</i>	ACTAAGCCGCGGCTCAGAAGGGGAGAGAGTAGTAGTGCATGCTTT-----T-----AAGAGAGGTATCG-----									

	1510	1520	1530	1540	1550	1560	1570	1580	1590	1600
SZMC 13082 <i>B.spicifera</i>	AGTC	TGACTGCAC	CAGCTAGTAAC	TTGTTATTGAGCACCAGCTAGTAAC	TTGTAACCAAGCTAGTAAC	TTGTGATT			TTTG	A
SZMC 13085 <i>B.hawaiiensis</i>	AGTTG	TAGCAGCAGTAGCAGCTAGTAAC	TTGTGGGTGGTAGCAGCTAGTAAC	TTG				TCGGATTGTTTCG		A
SZMC 13086 <i>B.australiensis</i>		TGCAGTAAC	TAATTTGTTG	CACCAGCCAGTAAC	TTC			TT	TTTGCTGTTA	

	1610	1620	1630	1640	1650	1660	1670	1680	1690	1700
SZMC 13082 <i>B.spicifera</i>	CCAAGTCCCAC	AGCAGCAGCTAGTAAC	TT			GTCA	TTTTT		AGTCACCA	GCTAG
SZMC 13085 <i>B.hawaiiensis</i>	CCAAGTCCAACTGCAGCAGCTAGTAAC	TT				GC	GGTTTTCGGTTTTCGACCAAGTCCAA	CAA		
SZMC 13086 <i>B.australiensis</i>	CCAAGTCCGAC	TGCTCCGTGCAGTAAC	TTCGAAATCTGCCATTG	CAGCCGATTG	GGCT		GTCT		AAGC	CAACTTG

	1710	1720	1730	1740	1750	1760	1770	1780	1790	1800
SZMC 13082 <i>B.spicifera</i>	TAACTTGAC	CAGCTAGTAAC	TTGTCAATTTT	TGACCAAGTCCCACTGCAGCAG						CTAGTAAC
SZMC 13085 <i>B.hawaiiensis</i>		CTGCAGCAGCTAGTAAC	TTG	GC	GGT					
SZMC 13086 <i>B.australiensis</i>	AAAA	TAGCCAAAGTAGCTAATAA		GA		G	TAGGAAATCTATCCCCAGCGATAGAACGCTTAGATCTAGTAGTTG			

	1810	1820	1830	1840	1850	1860	1870	1880	1890	1900
SZMC 13082 <i>B.spicifera</i>	GTCA	TTTTT		TAGTC		ACCAGCTAGTAAC	TTG			ACCAG
SZMC 13085 <i>B.hawaiiensis</i>		TTTT		TTGGTTTCCAACCAAGTCTAATCTAGCAGCTAGTAAC	TTGTTGGGTTTGGTTTTCGACCAAGTCCGACTTCAGCAG					
SZMC 13086 <i>B.australiensis</i>	ATAA	TTTTTGGCAAAAGTTGATTTT	TGTC		AGCATGTAGTAAC	TT				

	1910	1920	1930	1940	1950	1960	1970	1980	1990	2000
SZMC 13082 <i>B.spicifera</i>	CTAGTAAC	TTGTCAATT	TTTTG	ACCAAGTCCCACT						
SZMC 13085 <i>B.hawaiiensis</i>	CTAGTAAC	TTGTC	GATTTTGTATCTTCAACCAAGTCCAA	CCGCGCCAGCTAGTAAC	TTGGAACTTTTGT	TTTTTCCAAATTATAGCCAAC	CTTGG			
SZMC 13086 <i>B.australiensis</i>		ATTTCT	GTT	GTCCA	ACTGCTCCGTG	CAGTAAC	TTCGAAATCTG		CCTATTGCAGCCG	CAATTGG

	2010	2020	2030	2040	2050	2060	2070	2080	2090	2100
SZMC 13082 <i>B.spicifera</i>						GCAGCAGCTAGTAAC	TTGT			CATTTT-TAG
SZMC 13085 <i>B.hawaiiensis</i>	CTACTACATCTAATGTAGAAGTAGCCTCAAGTAGCTG			AGTAG			ATAGAGCAGAGAACAAATAAGTAGAT			
SZMC 13086 <i>B.australiensis</i>	CTGTCTAAGCCAACTTGAAATAGCCAAAGTAGCTAATAAGAGTAG								GAAATC-TAT	

	2110	2120	2130	2140	2150	2160	2170	2180	2190	2200
SZMC 13082 <i>B.spicifera</i>	TCACCAGCTAGTAAC	TTGACCAGCTAGTAAC	TTGTCAATTTT	TGACCAAGTCCCACTGCAGCAGCTAGTAAC	TTG					TCAT
SZMC 13085 <i>B.hawaiiensis</i>		AGTTA		TAGTAG			TAGTAGCTAGAGATTTAGAGTCTTGTCT		T	
SZMC 13086 <i>B.australiensis</i>	CCCCAGCGA		TAGAAGCGCTTA			GATCTAGTAGTTG			A	TAA

	2210	2220	2230	2240	2250	2260	2270	2280	2290	2300
SZMC 13082 <i>B.spicifera</i>		TTTTAGTCA	CCAGCTAGAAGGGGATCGCCAAAAAAGCAATCCCAATCGCCCGCTTTGAAACACGCAGTAAAGCGTGTGTCGCGG							
SZMC 13085 <i>B.hawaiiensis</i>		TTATAAT	AGCTAGAAGGGGATCGCCAAAAAAGCAATCCCAATCGCCCGCTTTGAAACGCAGTAAAGCGTGTGTCGCGG							
SZMC 13086 <i>B.australiensis</i>	TTTTTGGCAAAAGTTGATTTT	TGTGAGCATGTAGAAGGGGATCGCCAAAAAAGCAATCCCAATCGCCCGCTTTGAAACGCAGTAAAGCGTGTGTCGCGG								

2310 2320 2330 2340 2350 2360 2370 2380 2390 2400

SZMC 13082 *B. spicifera* CGGACGACTATTCTAATTGCCCCCACTGAGTTCCCCAAGGCACGGTCCGCGATGGATCTCGACCAAGCGTTGCCGCTAGTAGCAAGCCCCAACATGCGTGG

SZMC 13085 *B. hawaiiensis* CGGACGACTATTCTAATTGCCCCCACTGAGTTCCCCAAGGCACGGTCCGCGATGGATCTCGACCAAGCGTTGCCGCTAGTAGCAAGCCCCAACATGCGTGG

SZMC 13086 *B. australiensis* CAGACGACTATTCTAATTGCCCCCACTGAGTTCCCCAAGGCACGGTCCGCGACGGATCTCGACTAGCGTTGCCACAGTAGCAAGCCCCATAGCATGCGCG

2410 2420 2430 2440 2450 2460 2470 2480 2490 2500

SZMC 13082 *B. spicifera* CCTCAAGAGGAGGTAAACCCACGCCGACTCGACGCGCAAGCGGGATAGCCGGCAGGGTCCGCCCAAGATCTGGTGAATCGGTTGGCAAAGCCAGCAAT

SZMC 13085 *B. hawaiiensis* CCTCAAGAGGAGGTAAACCCACGCCGACTCGACGCGCAAGCGGGATAGCCGGCAGGGTCCGCCCAAGATCTGGTGAATCGATTGGCAAAGCCAGCAAT

SZMC 13086 *B. australiensis* CCTCAAGAGGAGGTAAACCCACGCCGACTCGACGCGCAAGCGGGATAGTCGACAGGGTCCGCCCAAGATCTGGTGAATTGGTTGGCAAAGCCAGCAAT

2510 2520 2530 2540 2550 2560 2570 2580 2590 2600

SZMC 13082 *B. spicifera* CCACAGACCCCCAAATGGTGCCCGCTCATGGTGGTGAGCAGGACTTCGGGTGTCACTCGCCAAAAACGGGCGCAATACCAGCGGTACCGCTTCAATATATA

SZMC 13085 *B. hawaiiensis* CCACAGACCCCCAAATGGTGCCCGCTCATGGTGGTGAGCAGGACTTCGGGTGTCACTCGCCAAAAATGGGCGCAGCACCGCGGTACCGCTTCAATATATA

SZMC 13086 *B. australiensis* CCACAGACCCCCAAATGGTGCCCGCTCATGGTGGTGAGCAGGACTTCGGGTGTCAATCGCCAAAAATGGGCGCAATACCAGCGGTACCGCTTCAATATATA

2610 2620 2630 2640 2650 2660 2670 2680 2690 2700

SZMC 13082 *B. spicifera* GGCTTTGCGCCGCCCATTCAGCGCCCAACAGTCGCTAAGC-CCCGGGTTTGGCTGTAACAGAGTTGACGTCTCCAACCAAAACCTAGGTAAACAAGCT

SZMC 13085 *B. hawaiiensis* GGCTTTGCGCCGCCCATTCAGCGCCCAACAGTCGCTAAGC-CCCGGGTTTGGCTGTAACAGAGTTGACGTCTCCAACCAAAACCTAGGTAAACAAGCT

SZMC 13086 *B. australiensis* GGCTTTGCGCCGCCCATTCAGCGCTGACAGTTTGCTTCGACCCCTGATTTTGGCTCGGACAGAGTTGACGTCTCCAACCAAAATCTGGGTAAACAAGCT

2710 2720 2730 2740 2750 2760 2770 2780 2790 2800

SZMC 13082 *B. spicifera* GGCAGGTAAGATACCAGATGTTGGGTGCGCTC-TCGCCGAAAGAGAGAAACAGCTGG-GGTATCGACACCGCGACAAAGGGGCGACCTGGCGCAATTA

SZMC 13085 *B. hawaiiensis* GGCAGGTAAGATACCAGAGATTGGGTGCGCTCCTCGCTCGAAAGAGAGAAAGCAGCTGGGGGGTATCGACACCGCGACAAAGGGGCGACCTGGCGCGTTA

SZMC 13086 *B. australiensis* AGCAGGTAAGATACCAATAATTAATCTATTC-TCGCCGAAAGAGAGAAATAATTTG-GGCTGCGA-ACCGCGACATGGGGCGACCTAGCGCTAATA

2810 2820 2830 2840 2850 2860 2870 2880 2890 2900

SZMC 13082 *B. spicifera* AGCAGCGCAGTAT-AGCCAGCAGCCCGATAGACCCCGCGAAATCGCCACCTAGACGCAATAGTCCGCCAGTTGGTTGCCAACAGCAGGCCCATAG

SZMC 13085 *B. hawaiiensis* AGCAGCGCAGTAT-AGCCAGCAGCCCGATAGACCCCGCGAAATCGCTACTTGGAGCAATGGTCCGCCAGTTGGTTGCCAACAGCAGGCCCATAG

SZMC 13086 *B. australiensis* AA-AGCGTAGTATAAGCCAGCAGCCCGACAGATCCCGCCAAATCGCCACCTGCAAGCGCAATAGTCCGCCAGTTAGTTGCCAACAGCAGGCCGTATAG

2910 2920 2930 2940 2950 2960 2970 2980 2990 3000

SZMC 13082 *B. spicifera* CCGCAAAATACTCAATCAGCACTGAGACGCTGCCTGAGACCCATATTGGATCTCAGGTGCTCTTCTCATATAACGTGGGAACGGGTTTGGGTGCGATTTT

SZMC 13085 *B. hawaiiensis* CCGCAAAATACTCAATTAGCACTGAGACGCTGCCTGAGACCCATATTGGATCTCAGGTGCTCTTCTCATATAACGTGGGAACGGGTTTGGGTGCAATTTT

SZMC 13086 *B. australiensis* CCGCAAAATACTCAATCGACCTGAGACGCTGCCTTTGACCCATACTGGGTCTCAGGTGCTCTTCTCATATAACGTGGGAACGGGTTTGGGTGCGATTTT

3010 3020 3030 3040 3050 3060

SZMC 13082 *B. spicifera* CCCCCGCGGAGTTAAGTCTGACGTCGACAAACCGGAGCTCCGGTCCCCCAACCACTGCCAAAAC

SZMC 13085 *B. hawaiiensis* CGCCTCGCGGAGTTCCCGCGGAGCTCGACAAACCGGAGCTCCGGTCCCCCACTATATGATCAAAAC

SZMC 13086 *B. australiensis* CGCCTCGCGGAGTTAAGTCCCGGGGAAAAAACCGGAGCTCCGGTCCCCCACTACATAGCCAAAAC

2. számú melléklet: Az *tef* (1-750) + ITS (751-1222) + *tub* (1223-1860) + RAPD bináris mátrix (1861-1932) + IGS1 (1933-3542) + IGS2 (3543-4463) adatokat tartalmazó illesztés, melyből a 12. ábrán látható filogramot kaptuk a Bayes-féle analízis során (5×10^7 generáció; burn-in 3×10^4 ; a partíciókhoz legmegfelelőbb modellek: ITS – K2P modell, *tef* – GTR+G modell, *tub* – K2P modell, RAPD bináris mátrix – egyparaméters Markov modell, IGS1 és IGS2 – GTR+G modell).

SZMC 13058
 SZMC 13059
 SZMC 13060
 SZMC 13061
 SZMC 13062
 SZMC 13064
 SZMC 13065
 SZMC 13066
 SZMC 13067
 SZMC 13068
 SZMC 13069
 SZMC 21168
 SZMC 13070
 SZMC 13071
 SZMC 13073
 SZMC 13074
 SZMC 13075
 SZMC 13063
 SZMC 13078
 SZMC 13079
 SZMC 13080
 SZMC 21169
 SZMC 13081 B.spicifera
 SZMC 13082 B.spicifera*
 SZMC 13083 B.hawaiiensis
 SZMC 13084 B.hawaiiensis
 SZMC 13085 B.hawaiiensis*
 SZMC 13086 B.australiensis*
 SZMC 13087 B.australiensis
 SZMC 13088 B.spicifera
 SZMC 13041 Co.australiensis
 SZMC 13042 Co.hawaiiensis
 SZMC 13044 Co.australiensis
 SZMC 13056 Co.hawaiiensis
 SZMC 13057 Co.spicifera
 SZMC 13012 B.sorokiniana

[illegible]

		310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
										
SZMC 13058		AAGGCCAAGGCCACTGGTAAGACCCCTCCTCGAGGCCATCGACGCCATCGACCCCCCTGTCCGTCCCAACGCAAGCCCCCTCCGCCCTCCCCCTCCAGGATG									
SZMC 13059		AAGGCCAAGGCCACTGGTAAGACCCCTTCTCGAGGCCATCGACGCCATCGACCCCTCCTGTCCGTCCCAACGCAAGCCCCCTCCGCCCTCCCCCTCCAGGATG									
SZMC 13060		AAGGCCAAGGCCACTGGTAAGACCCCTCCTCGAGGCCATCGACGCCATCGACCCCCCTGTCCGTCCCAACGCAAGCCCCCTCCGCCCTCCCCCTCCAGGATG									
SZMC 13061		AAGGCCAAGGCCACTGGTAAGACCCCTTCTCGAGGCCATCGACGCCATCGACCCCTCCTGTCCGTCCCAACGCAAGCCCCCTCCGCCCTCCCCCTCCAGGATG									
SZMC 13062											
SZMC 13064		AAGGCCAAGGCCACTGGTAAGACCCCTCCTCGAGGCCATCGACGCCATCGACCCCCCTGTCCGTCCCAACGCAAGCCCCCTCCGCCCTCCCCCTCCAGGATG									
SZMC 13065		AAGGCCAAGGCCACTGGTAAGACCCCTTCTCGAGGCCATCGACGCCATCGACCCCCCTGTCCGTCCCAACGCAAGCCCCCTCCGCCCTCCCCCTCCAGGATG									
SZMC 13066		AAGGCCAAGGCCACTGG									
SZMC 13067		AAGGCCAAGGCCACTGGTAAGACCCCTTCTCGAGGCCATCGACGCCATCGACCCCCCTGTCCGTCCCAACGCAAGCCCCCTCCGCCCTCCCCCTCCAGGATG									
SZMC 13068		AAGGCCAAGGCCACTGGTAAGACCCCTCCTCGAGGCCATCGACGCCATCGACCCCCCTGTCCGTCCCAACGCAAGCCCCCTCCGCCCTCCCCCTCCAGGATG									
SZMC 13069		AAGGCCAAGGCCACTGGTAAGACCCCTTCTCGAGGCCATCGACGCCATCGACCCCCCTGTCCGTCCCAACGCAAGCCCCCTCCGCCCTCCCCCTCCAGGATG									
SZMC 21168		AAGGCCAAGGCCACTGGTAAGACCCCTCCTCGAGGCCATCGACGCCATCGACCCCCCTGTCCGTCCCAACGCAAGCCCCCTCCGCCCTCCCCCTCCAGGATG									
SZMC 13070		AAGGCCAAGGCCACTGGTAAGACCCCTTCTCGAGGCCATCGACGCCATCGACCCCCCTGTCCGTCCCAACGCAAGCCCCCTCCGCCCTCCCCCTCCAGGATG									
SZMC 13071		AAGGCCAAGGCCACTGGTAAGACCCCTCCTCGAGGCCATCGACGCCATCGACCCCCCTGTCCGTCCCAACGCAAGCCCCCTCCGCCCTCCCCCTCCAGGATG									
SZMC 13073		AAGGCCAAGGCCACTGGTAAGACCCCTCCTCGAGGCCATCGACGCCATCGACCCCCCTGTCCGTCCCAACGCAAGCCCCCTCCGCCCTCCCCCTCCAGGATG									
SZMC 13074		AAGGCCAAGGCCACTGGTAAGACCCCTTCTCGAGGCCATCGACGCCATCGACCCCCCTGTCCGTCCCAACGCAAGCCCCCTCCGCCCTCCCCCTCCAGGATG									
SZMC 13075		AAGGCCAAGGCCACTGGTAAGACCCCTCCTCGAGGCCATCGACGCCATCGACCCCCCTGTCCGTCCCAACGCAAGCCCCCTCCGCCCTCCCCCTCCAGGATG									
SZMC 13063		AAGGCCAAGGCCACTGGTAAGACCCCTTCTCGAGGCCATCGACGCCATCGACCCCTCCTGTCCGTCCCAACGCAAGCCCCCTCCGCCCTCCCCCTCCAGGATG									
SZMC 13078											
SZMC 13079											
SZMC 13080		AAGGCCAAGGCCACTGGTAAGACCCCTCCTCGAGGCCATCGACGCCATCGACCCCCCTGTCCGTCCCAACGCAAGCCCCCTCCGCCCTCCCCCTCCAGGATG									
SZMC 21169		AAGGCCAAGGCCACTGGTAAGACCCCTCCTCGAGGCCATCGACGCCATCGACCCCCCTGTCCGTCCCAACGCAAGCCCCCTCCGCCCTCCCCCTCCAGGATG									
SZMC 13081	B.spicifera	AAGGCCAAGGCCACTGGTAAGACCCCTCCTCGAGGCCATCGACGCCATCGACCCCCCTGTCCGTCCCAACGCAAGCCCCCTCCGCCCTCCCCCTCCAGGATG									
SZMC 13082	B.spicifera*	AAGGCCAAGGCCACTGGTAAGACCTCTCCTCGAGGCCATCGACGCCATCGACGCCCCCTGTCCGTCCCAACGCAAGCCCCCTCCGCCCTCCCCCTCCAGGATG									
SZMC 13083	B.hawaiiensis	AAGGCCAAGGCCACTGGTAAGACCCCTTCTCGAGGCCATCGACGCCATCGACCCCTCCTGTCCGTCCCAACGCAAGCCCCCTCCGCCCTCCCCCTCCAGGATG									
SZMC 13084	B.hawaiiensis	AAGGCCAAGGCCACTGGTAAGACCCCTTCTCGAGGCCATCGACGCCATCGACCCCTCCTGTCCGTCCCAACGCAAGCCCCCTCCGCCCTCCCCCTCCAGGATG									
SZMC 13085	B.hawaiiensis*	AAGGCCAAGGCCACTGGTAAGACCCCTTCTCGAGGCCATCGACGCCATCGACCCCTCCTGTCCGTCCCAACGCAAGCCCCCTCCGCCCTCCCCCTCCAGGATG									
SZMC 13086	B.australiensis*	AAGACCAAGTCCACTGGTAAGACCCCTCCTTGAGGCCATCGACGCCATCGACACCCCTGTCCGTCCCAACGCAAGCCCCCTCCGCCCTCCTCTCCAGGATG									
SZMC 13087	B.australiensis	AAGGCCAAGGCCACTGGTAAGACCTCTCCTCGAGGCCATCGACGCCATCGACGCCCCCTGTCCGTCCCAACGCAAGCCCCCTCCGCCCTCCCCCTCCAGGATG									
SZMC 13088	B.spicifera	AAGGCCAAGGCCACTGGTAAGACCTCTCCTCGAGGCCATCGACGCCATCGACGCCCCCTGTCCGTCCCAACGCAAGCCCCCTCCGCCCTCCCCCTCCAGGATG									
SZMC 13041	Co.australiensis	AAGGCCAAGGCCACTGGTAAGACCCCTCCTCGAGGCCATCGACGCCATCGACGCCCCCTGTCCGCCCTACCGCAAGCCCCCTCCGTCTTCCCCCTCCAGGATG									
SZMC 13042	Co.hawaiiensis	AAGGCCAAGGCCACTGGTAAGACCCCTTCTCGAGGCCATCGACGCCATCGACCCCCCTGTCCGTCCCAACGCAAGCCCCCTCCGCCCTCCCCCTCCAGGATG									
SZMC 13044	Co.australiensis	AAGGCCAAGGCCACTGGTAAGACCCCTCCTCGAGGCCATCGACGCCATCGACACCCCTGTCCGTCCCAACGCAAGCCCCCTCCGTCTTCCCCCTCCAGGATG									
SZMC 13056	Co.hawaiiensis	AAGGCCAAGGCCACTGGTAAGACCCCTTCTCGAGGCCATCGACGCCATCGACCCCCCTGTCCGTCCCAACGCAAGCCCCCTCCGCCCTCCCCCTCCAGGATG									
SZMC 13057	Co.spicifer	AAGACCAAGTCCACTGGTAAGACCCCTCCTTGAGGCCATCGACGCCATCGACACCCCTGTCCGTCCCAACGCAAGCCCCCTCCGCCCTCCTCTCCAGGATG									
SZMC 13012	B.sorokiniana	AAGTCTAAGTCCACTGGTAAGACCCCTCCTCGAGGCCATCGATGCTATCGACCCCTCCAGCCGTCTTACCGCAAGCCCCCTCCGTCTTCCCCCTCCAGGATG									

		410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
SZMC 13058										
SZMC 13059		TCTACAAGATTGGTGGTATTGGCACGGTTCCCGTCGGTCGTCGAGACCGGTATCATCAAGCCC									
SZMC 13060		TCTACAAGATTGGTGGTATTGGCACGGTTCCCGTCGGTCGTCGAGACCGGTATCATCAAGCCC									
SZMC 13061		TCTACAAGATTGGTGGTATTGGCACGGTTCCCGTCGGTCGTCGAGACCGGTATCATCAAGCCC									
SZMC 13062											
SZMC 13064		TCTACAAGATTGGTGGTATTGGCACGGTTCCCGTCGGTCGTCGAGACCGGTATCATCAAGCCC									
SZMC 13065		TGTACAAGATTGGTGGTATTGGCACGGTTCCCGTCGGTCGTCGAGACCGGTATCATCAAGCCC									
SZMC 13066											
SZMC 13067		TGTACAAGATTGGTGGTATTGGCACGGTTCCCGTCGGTCGTCGAGACCGGTATCATCAAGCCC									
SZMC 13068		TCTACAAGATTGGTGGTATTGGCACGGTTCCCGTCGGTCGTCGAGACCGGTATCATCAAGCCC									
SZMC 13069		TGTACAAGATTGGTGGTATTGGCACGGTTCCCGTCGGTCGTCGAGACCGGTATCATCAAGCCC									
SZMC 21168		TCTACAAGATTGGTGGTATTGGCACGGTCCCGTCGGTCGTCGAGACCGGTATCATCAAGCCC									
SZMC 13070		TGTACAAGATTGGTGGTATTGGCACGGTTCCCGTCGGTCGTCGAGACCGGTATCATCAAGCCC									
SZMC 13071		TCTACAAGATTGGTGGTATTGGCACGGTTCCCGTCGGTCGTCGAGACCGGTATCATCAAGCCC									
SZMC 13073		TCTACAAGATTGGTGGTATTGGCACGGTTCCCGTCGGTCGTCGAGACCGGTATCATCAAGCCC									
SZMC 13074		TGTACAAGATTGGTGGTATTGGCACGGTTCCCGTCGGTCGTCGAGACCGGTATCATCAAGCCC									
SZMC 13075		TCTACAAGATTGGTGGTATTGGCACGGTTCCCGTCGGTCGTCGAGACCGGTATCATCAAGCCC									
SZMC 13063		TCTACAAGATTGGTGGTATTGGCACGGTTCCCGTCGGTCGTCGAGACCGGTATCATCAAGCCC									
SZMC 13078											
SZMC 13079											
SZMC 13080		TCTACAAGATTGGTGGTATTGGCACGGTCCCGTCGGTCGTCGAGACCGGTATCATCAAGCCC									
SZMC 21169		TCTACAAGATTGGTGGTATTGGCACGGTCCCGTCGGTCGTCGAGACCGGTATCATCAAGCCC									
SZMC 13081	B.spicifera	TCTACAAGATTGGTGGTATTGGCACGGTTCCCGTCGGTCGTCGAGACCGGTATCATCAAGCCC									
SZMC 13082	B.spicifera*	TCTACAAGATTGGTGGTATTGGCACGGTTCCCGTCGGTCGTCGAGACCGGTATCATCAAGCCC									
SZMC 13083	B.hawaiiensis	TCTACAAGATTGGTGGTATTGGCACGGTTCCCGTCGGTCGTCGAGACCGGTATCATCAAGCCC									
SZMC 13084	B.hawaiiensis	TCTACAAGATTGGTGGTATTGGCACGGTTCCCGTCGGTCGTCGAGACCGGTATCATCAAGCCC									
SZMC 13085	B.hawaiiensis*	TCTACAAGATTGGTGGTATTGGCACGGTTCCCGTCGGTCGTCGAGACCGGTATCATCAAGCCC									
SZMC 13086	B.australiensis*	TCTACAAGATTGGTGGTATTGGCACGGTTCCCGTCGGTCGTCGAGACCGGTATCATCAAGCCC									
SZMC 13087	B.australiensis	TCTACAAGATTGGTGGTATTGGCACGGTTCCCGTCGGTCGTCGAGACCGGTATCATCAAGCCC									
SZMC 13088	B.spicifera	TCTACAAGATTGGTGGTATTGGCACGGTTCCCGTCGGTCGTCGAGACCGGTATCATCAAGCCC									
SZMC 13041	Co.australiensis	TCTACAAGATTGGTGGTATTGGCACGGTTCCCGTCGGTCGTCGAGACCGGTATCATCAAGCCC									
SZMC 13042	Co.hawaiiensis	TGTACAAGATTGGTGGTATTGCCACGGTTCCCGTCGGTT									
SZMC 13044	Co.australiensis	TCTACAAGATTGGTGGTATTGGCACGGTTCCCGTCGGTCGTCGAGACCGGTATCATCAAGCCC									
SZMC 13056	Co.hawaiiensis	TGTACAAGATTGGTGGTATTGGCACGGTTCCCGTCGGTCGTCGAGACCGGTATCATCAAGCCC									
SZMC 13057	Co.spicifer	TCTACAAGATTGGTGGTATTGGCACGGTTCCCGTCGGTCGTCGAGACCGGTATCATCAAGCCC									
SZMC 13012	B.sorokiniana	TGTACAAGATCGGTGGTATTGGCACGGTTCCCGTCGGTCGTCGAGACCGGTATCATCAAGCCC									

510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
 SZMC 13058 CACTGAAGTCAAGTCCGTCGAGATGCACCACGAGCAGCTTACCAGAGGGTGTCCCCGGTGACAACGTCGGCTTCAACGTC AAGAACGTCTCCGTC AAGGAG
 SZMC 13059 CACTGAAGTCAAGTCCGTCGAGATGCACCACGAGCAGCTTGCCGAGGGTGTCCCCGGTGACAACGTCGGCTTCAACGTC AAGAACGTCTCCGTC AAGGAG
 SZMC 13060 CACTGAAGTCAAGTCCGTCGAGATGCACCACGAGCAGCTTACCAGAGGGTGTCCCCGGTGACAACGTCGGCTTCAACGTC AAGAACGTCTCCGTC AAGGAG
 SZMC 13061 CACTGAAGTCAAGTCCGTCGAGATGCACCACGAGCAGCTTGCCGAGGGTGTCCCCGGTGACAACGTCGGCTTCAACGTC AAGAACGTCTCCGTC AAGGAG
 SZMC 13062
 SZMC 13064 CACTGAAGTCAAGTCCGTCGAGATGCACCACGAGCAGCTTACCAGAGGGTGTCCCCGGTGACAACGTCGGTTTCAACGTC AAGAACGTCTCCGTC AAGGAG
 SZMC 13065 CACTGAAGTCAAGTCCGTCGAGATGCACCACGAGCAGCTTGCCGAGGGTGTCCCCGGTGACAACGTCGGCTTCAACGTC AAGAACGTCTCCGTC AAGGAG
 SZMC 13066
 SZMC 13067 CACTGAAGTCAAGTCCGTCGAGATGCACCACGAGCAGCTTGCCGAGGGTGTCCCCGGTGACAACGTCGGCTTCAACGTC AAGAACGTCTCCGTC AAGGAG
 SZMC 13068 CACTGAAGTCAAGTCCGTCGAGATGCACCACGAGCAGCTTACCAGAGGGTGTCCCCGGTGACAACGTCGGCTTCAACGTC AAGAACGTCTCCGTC AAGGAG
 SZMC 13069 CACTGAAGTCAAGTCCGTCGAGATGCACCACGAGCAGCTTGCCGAGGGTGTCCCCGGTGACAACGTCGGCTTCAACGTC AAGAACGTCTCCGTC AAGGAG
 SZMC 21168 CACTGAAGTCAAGTCCGTCGAGATGCACCACGAGCAGCTGACCAGGGTGTCCCCGGTGACAACGTCGGCTTCAACGTC AAGAACGTCTCCGTC AAGGAG
 SZMC 13070 CACTGAAGTCAAGTCCGTCGAGATGCACCACGAGCAGCTTGCCGAGGGTGTCCCCGGTGACAACGTCGGCTTCAACGTC AAGAACGTCTCCGTC AAGGAG
 SZMC 13071 CACTGAAGTCAAGTCCGTCGAGATGCACCACGAGCAGCTTACCAGAGGGTGTCCCCGGTGACAACGTCGGCTTCAACGTC AAGAACGTCTCCGTC AAGGAG
 SZMC 13073 CACTGAAGTCAAGTCCGTCGAGATGCACCACGAGCAGCTTACCAGAGGGTGTCCCCGGTGACAACGTCGGTTTCAACGTC AAGAACGTCTCCGTC AAGGAG
 SZMC 13074
 SZMC 13075 CACTGAAGTCAAGTCCGTCGAGATGCACCACGAGCAGCTTACCAGAGGGTGTCCCCGGTGACAACGTCGGCTTCAACGTC AAGAACGTCTCCGTC AAGGAG
 SZMC 13063 CACTGAAGTCAAGTCCGTCGAGATGCACCACGAGCAGCTTGCCGAGGGTGTCCCCGGTGACAACGTCGGCTTCAACGTC AAGAACGTCTCCGTC AAGGAG
 SZMC 13078
 SZMC 13079
 SZMC 13080 CACTGAAGTCAAGTCCGTCGAGATGCACCACGAGCAGCTCACCAGAGGGTGTCCCCGGTGACAACGTCGGCTTCAACGTC AAGAACGTCTCCGTC AAGGAG
 SZMC 21169 CACTGAAGTCAAGTCCGTCGAGATGCACCACGAGCAGCTCACCAGAGGGTGTCCCCGGTGACAACGTCGGCTTCAACGTC AAGAACGTCTCCGTC AAGGAG
 SZMC 13081 B.spicifera CACTGAAGTCAAGTCCGTCGAGATGCACCACGAGCAGCTTACCAGAGGGTGTCCCCGGTGACAACGTCGGCTTCAACGTC AAGAACGTCTCCGTC AAGGAG
 SZMC 13082 B.spicifera* CACTGAAGTCAAGTCCGTCGAGATGCACCACGAGCAGCTTACCAGAGGGTGTCCCCGGTGACAACGTCGGCTTCAACGTC AAGAACGTCTCCGTC AAGGAG
 SZMC 13083 B.hawaiiensis CACTGAAGTCAAGTCCGTCGAGATGCACCACGAGCAGCTTGCCGAGGGTGTCCCCGGTGACAACGTCGGCTTCAACGTC AAGAACGTCTCCGTC AAGGAG
 SZMC 13084 B.hawaiiensis CACTGAAGTCAAGTCCGTCGAGATGCACCACGAGCAGCTTGCCGAGGGTGTCCCCGGTGACAACGTCGGCTTCAACGTC AAGAACGTCTCCGTC AAGGAG
 SZMC 13085 B.hawaiiensis* CACTGAAGTCAAGTCCGTCGAGATGCACCACGAGCAGCTTGCCGAGGGTGTCCCCGGTGACAACGTCGGCTTCAACGTC AAGAACGTCTCCGTC AAGGAG
 SZMC 13086 B.australiensis* CACTGAAGTCAAGTCCGTCGAGATGCACCACGAGCAGCTTACCAGAGGGTGTCCCCGGTGACAACGTCGGCTTCAACGTC AAGAACGTCTCCGTC AAGGAG
 SZMC 13087 B.australiensis CACTGAAGTCAAGTCCGTCGAGATGCACCACGAGCAGCTTACCAGAGGGTGTCCCCGGTGACAACGTCGGCTTCAACGTC AAGAACGTCTCCGTC AAGGAG
 SZMC 13088 B.spicifera CACTGAAGTCAAGTCCGTCGAGATGCACCACGAGCAGCTTACCAGAGGGTGTCCCCGGTGACAACGTCGGCTTCAACGTC AAGAACGTCTCCGTC AAGGAG
 SZMC 13041 Co.australiensis CACTGAAGTCAAGTCCGTCGAGATGCACCACGAGCAGCTTACCAGAGGGTGTCCCCGGTGACAACGTCGGCTTCAACGTC AAGAACGTCTCCGTC AAGGAG
 SZMC 13042 Co.hawaiiensis
 SZMC 13044 Co.australiensis CACTGAAGTCAAGTCCGTCGAGATGCACCACGAGCAGCTTACCAGAGGGTGTCCCCGGTGACAACGTCGGCTTCAACGTC AAGAACGTCTCCGTC AAGGAG
 SZMC 13056 Co.hawaiiensis CACTGAAGTCAAGTCCGTCGAGATGCACCACGAGCAGCTTGCCGAGGGTGTCCCCGGTGACAACGTCGGCTTCAACGTC AAGAACGTCTCCGTC AAGGAG
 SZMC 13057 Co.spicifer CACTGAAGTCAAGTCCGTCGAGATGCACCACGAGCAGCTTACCAGAGGGTGTCCCCGGTGACAACGTCGGCTTCAACGTC AAGAACGTCTCCGTC AAGGAG
 SZMC 13012 B.sorokiniana CACTGAGGTC AAGTCCGTCGAGATGCACCACGAGCAGCTGACCAGAGGGTGTCCCCGGTGACAACGTCGGTTTCAACGTC AAGAACGTCTCCGTC AAGGAG

[illegible]

	710	720	730	740	750	760	770	780	790	800
SZMC 13058	TCGGTGCCGGTTACGCACCAGTCCCTTGACTGCCACACTGCCACATTGCTCGTT	CG	CGGCTGGAC	TATTT	ATTACCCCTTGCTTTTGCGCACT					
SZMC 13059	TCGGTGCCGGTTACGCACCAGTCCCTTGACTGCCACACTGCCACATTGCTCGTT	CG	CGGCTGGAC	TATTT	ATTACCCCTTGCTTTTGCGCACT					
SZMC 13060	TCGGTGCCGGTTACGCACCAGTCCCTTGACTGCCACACTGCCACATTGCTCGTT	CG	CGGCTGGAC	TATTT	ATTACCCCTTGCTTTTGCGCACT					
SZMC 13061	TCGGTGC		TTTCG	CGGCTGGAC	TATTT	ATTACCCCTTGCTTTTGCGCACT				
SZMC 13062				CGTTTCG	CGGCTGGAC	TATTT	ATTACCCCTTGCTTTTGCGCACT			
SZMC 13064	TCGGTGCCGGTTACGCACCAGTCCCTTGACTGCCACACTGCCACATTGCTCGTT	CG	CGGCTGGAC	TATTT	ATTACCCCTTGCTTTTGCGCACT					
SZMC 13065	TCGGTGCCGGTTACGCACCAGTCCCTTGACTGCCACACTGCCACATTGCTCGTT	CG	CGGCTGGAC	TATTT	ATTACCCCTTGCTTTTGCGCACT					
SZMC 13066				TTTCG	CGGCTGGAC	TATTT	ATTACCCCTTGCTTTTGCGCACT			
SZMC 13067	TCGGTGCCGGTTACGCACCAGTCCCTTGACTGCCACACTGCCACATTGCTCGTT	CG	CGGCTGGAC	TATTT	ATTACCCCTTGCTTTTGCGCACT					
SZMC 13068	TCGGTGCCGGTTACGCACCAGTCCCTTGACTGCCACACTGTC		AGCGT	CCGCCCAAGTATTT	TTACCCCATGCTTTTGCGCACT					
SZMC 13069	TCGGTGC		TTTCG	CGGCTGGAC	TATTT	ATTACCCCTTGCTTTTGCGCACT				
SZMC 21168	TCGGTGCCGGTTACGCACCAGTCCCTTGACTGCCACACTGCCACATTGCT			TATTT	ATTACCCCTTGCTTTTGCGCACT					
SZMC 13070	TCGGTGCCGGTTACGCACCAGTCCCTTGACTGCCACACTGCCACATTGCT		GGCTGGAC	TATTT	ATTACCCCTTGCTTTTGCGCACT					
SZMC 13071	TCGGTGCCGGTTACGCACCAGTCCCTTGACTGCCACACTGCCACATTGCTCGTT	CG	CGGCTGGAC	TATTT	ATTACCCCTTGCTTTTGCGCACT					
SZMC 13073	TCGGTGCCGGTTACGCACCAGTCCCTTGACTGCCACACTGCCACATTGCT	GTTTCG	CGGCTGGAC	TATTT	ATTACCCCTTGCTTTTGCGCACT					
SZMC 13074			CG	CGGCTGGAC	TATTT	ATTACCCCTTGCTTTTGCGCACT				
SZMC 13075	TCGGTGCCGGTTACGCACCAGTCCCTTGACTGCCACACTGCCACATTGCTCGTT	CG	CGGCTGGAC	TATTT	ATTACCCCTTGCTTTTGCGCACT					
SZMC 13063	TCGGTGCCGGTTACGCACCAGTCCCTTGACTGCCACACTGCCACATTGCTCGTT	CG	CGGCTGGAC	TATTT	ATTACCCCTTGCTTTTGCGCACT					
SZMC 13078				GCTGGAC	TATTT	ATTACCCCTTGCTTTTGCGCACT				
SZMC 13079				CGTTTCG	CGGCTGGAC	TATTT	ATTACCCCTTGCTTTTGCGCACT			
SZMC 13080	TCGGTGCCGGTTACGCACCAGTCCCTTGACTGCCACACTGCCACATTGCTGTC	CG	CAGCTGGAG	TATTT	ATTACCCCTTGCTTTTGCGCACT					
SZMC 21169	TCGGTGCCGGTTACGCACCAGTCCCTTGACTGCCACACTGCCACATTGCTGTC	CG	CAGCTGGAG	TATTT	ATTACCCCTTGCTTTTGCGCACT					
SZMC 13081 B.spicifera	TCGGTGCCGGTTACGCACCAGTCCCTTGACTGCCACACTGCCACATTGCTGTC	CG	CGGCTGGAC	TATTT	ATTACCCCTTGCTTTTGCGCACT					
SZMC 13082 B.spicifera*	TCGGTGCCGGTTACGCACCAGTCCCTTGACTGCCACACTGCTCATTGCTCGTT	CG	CGGCTGGAC	TATTT	ATTACCCCTTGCTTTTGCGCACT					
SZMC 13083 B.hawaiiensis	TCGGTGCCGGTTACGCACCAGTCCCTTGACTGCCACACTGCCACATTGCT	CG	CGGCTGGAC	TATTT	ATTACCCCTTGCTTTTGCGCACT					
SZMC 13084 B.hawaiiensis	TCGGTGCCGGTTACGCACCAGTCCCTTGACTGCCACACTGCCACATTGCT	GTTTCG	CGGCTGGAC	TATTT	ATTACCCCTTGCTTTTGCGCACT					
SZMC 13085 B.hawaiiensis*	TCGGTGCCGGTTACGCACCAGTCCCTTGACTGCCACACTGCCACATTGCT		CGGCTGGAC	TATTT	ATTACCCCTTGCTTTTGCGCACT					
SZMC 13086 B.australiensis*	TCGGTGCCGGTTACGCACCAGTCCCTTGACTGCCACACTGCCACATTGCT	TTTCG	CGGCTGGAC	TATTT	ATTACCCCTTGCTTTTGCGCACT					
SZMC 13087 B.australiensis	TCGGTGCCGGTTACGCACCAGTCCCTTGACTGCCACACTGCCACATTGCTCGTT	CG	CGGCTGGAC	TATTT	ATTACCCCTTGCTTTTGCGCACT					
SZMC 13088 B.spicifera	TCGGTGCCGGTTACGCACCAGTCCCTTGACTGCCACACTGCCACATTGCTCGTT	CG	CGGCTGGAC	TATTT	ATTACCCCTTGCTTTTGCGCACT					
SZMC 13041 Co.australiensis	TCGGTGCCGGTTACGCACCAGTCCCTTGACTGCCACACTGCCACATTGCTGAT	CG	CGGCTGGAC	TATTT	TATTACCCCTTGCTTTTGCGCACT					
SZMC 13042 Co.hawaiiensis										
SZMC 13044 Co.australiensis				CGTTTCG	CGGCTGGAC	TATTT	ATTACCCCTTGCTTTTGCGCACT			
SZMC 13056 Co.hawaiiensis	TCGGTGCCGGTTACGCACCAGTCCCTTGACTGCCACACTGCCACATTGCTCGTT	CG	CGGCTGGAC	TATTT	ATTACCCCTTGCTTTTGCGCACT					
SZMC 13057 Co.spicifer	TCGGTGCCGGTTACGCACCAGTCCCTTGACTGCCACACTGCCACATTGCTCGTT	CG	CGGCTGGAC	TATTT	ATTACCCCTTGCTTTTGCGCACT					
SZMC 13012 B.sorokiniana	TCGGTGCCGGTTACGCACCAGTCCCTTGACTGCCACACTGCCACATTGCC		GGCCGGCTGAAA	TATTTTTTTCACCCATGCTTTTGCGCACT						

[illegible]

	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200
SZMC 13058	TTGG	CC	CG	CCAAA	GA	CTC				
SZMC 13059	CCCC	CC		AAAAAGGGGA	CTC					
SZMC 13060	CCCC	CC		AAAAAGGGGA	CTC					
SZMC 13061	TTGG	CC	CG	CCAAA	GA	CTC				
SZMC 13062	TTGG	CC	CG	CCAAA	GA	CTC				
SZMC 13064	CCCC	CC		AAAAAGGGGA	CTC					
SZMC 13065	CCC			TAACAAGG	GA	CTC				
SZMC 13066	TTGG	CC	CG	CCAAA	GA	CTC				
SZMC 13067	CCC			TAACAAGG	GA	CTC				
SZMC 13068	CTCC	CCTT	TTGGG	GGAGACTC						
SZMC 13069	TTGG	CC	CG	CCAAA	GA	CTC				
SZMC 21168	TTGG	TC	GC	CCAAA	GA	CTC				
SZMC 13070	CCC			TAACAAGG	GA	CTC				
SZMC 13071	CCC			TAACAAGG	GA	CTC				
SZMC 13073	TTGG	CC	CG	CCAAA	GA	CTC				
SZMC 13074	CCC			TAACAAGG	GA	CTC				
SZMC 13075	TTGG	CC	CG	CCAAA	GA	CTC				
SZMC 13063	CCCC	CC		AAAAAGGGGA	CTC					
SZMC 13078	TTGG	CC	CG	CCAAA	GA	CTC				
SZMC 13079	TTGG	CC	CG	CCAAA	GA	CTC				
SZMC 13080	TTGG	TC	GC	CCAAA	GA	CTC				
SZMC 21169	TTGG	TC	GC	CCAAA	GA	CTC				
SZMC 13081 B.spicifera	ACAT	TT	GGTAAAT	GACCTG	ATTGCAACTGCATAAAAAGGTTTAT	ATTGGG	GC	CCT	GGTGG	
SZMC 13082 B.spicifera*	ACAT	TT	GGTAAAT	GACCTG	ATTGCAACTGCATAAAAAGGTTT					
SZMC 13083 B.hawaiiensis	CCC	CC		AAAAAGGGGA	CTC					
SZMC 13084 B.hawaiiensis	CCC	CC		AAAAAGGGGA	CTC					
SZMC 13085 B.hawaiiensis*	CCC	CC		AAAAAGGGGA	CTC					
SZMC 13086 B.australiensis*	TTGG	TTTGC	CCAAA	GA	CTC					
SZMC 13087 B.australiensis	TTGG	CC	CG	CCAAA	GA	CTC				
SZMC 13088 B.spicifera	TTGG	CC	CG	CCAAA	GA	CTC				
SZMC 13041 Co.australiensis	TTGGCTT	GC	CCAAA	GA	CTC					
SZMC 13042 Co.hawaiiensis										
SZMC 13044 Co.australiensis	ACAT	TT	GTGAAAT	GACCTG	ATTGCAACTGCATAAAAAGGTTTAT	ATTGGG	GC	CCT	GGTGG	
SZMC 13056 Co.hawaiiensis	CCC			TAACAAGG	GA	CTC				
SZMC 13057 Co.spicifer	TTGGGTT	CGCCAAA	GA	CTC						
SZMC 13012 B.sorokiniana	CCCT	CT	TT	CTGGG	AGA	CTC				

	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300
									
SZMC 13058	GCGCTTGCAATCAGCAAAAGAG									
SZMC 13059	GCGCTTGCAATCAGCAAAAGAG				AGCCTCCTTCATGGAGACCTTAC	CACGGAAGTAGGCAGAGCAGGT	CAGGTAGCGACC	GTTGC		
SZMC 13060	GCGCTTGCAATCAGCAAAAGAG			TGGTCCTCAACCTCCTTCATGGAGACCTTAC	CACGGAAGTAGGCAGAGCAGGT	CAGGTAGCGACC	GTTGC			
SZMC 13061	GCGCTTGCAATCAGCAAAAGAG	GCGCATCTGGTCCTCAACCTCCTTCATGGAGACCTTAC	TCGGAAGTAGACAGAGCAGGT	CAGGTAGCGACC	GTTGC					
SZMC 13062	GCGCTTGCAATCAGCAAAAGAGGCGCATCTGGTCCTCAACCTCCTTCATGGAGACCTTGC	CACGGAAGTAGGCAGAGCAGGT	CAGGTAGCGACC	GTTGC						
SZMC 13064	GCGCTTGCAATCAGCAAAAGAG									
SZMC 13065	GCGCTTGCAATCAGCAAAAGAGGCGCATCTGGTCCTCAACCTCCTTCATAGAGACCTTAC	CACGGAAGTAGGCAGAGCAGGT	CAGGTAGCGACC	GTTGC						
SZMC 13066	GCGCTTGCAATCAGCAAAAGAG	GCGCATCTGGTCCTCAACCTCCTTCATGGAGACCTTAC	ACGGAAGTAGGCAGAGCAGGT	CAGGTAGCGACC	GTTGC					
SZMC 13067	GCGCTTGCAATCAGCAAAAGAG									
SZMC 13068	GCGCCTTCCA ATCCAC									
SZMC 13069	GCGCTTGCAATCAGCAAAAGAG	GCGCATCTGGTCCTCAACCTCCTTCATGGAGACCTTAC	ACGGAAGTAGGCAGAGCAGGT	CAGGTAGCGACC	GTTGC					
SZMC 21168	GCGCTTGCCATCAGCAAAAGAG	GCGCATCTGGTCCTCAACCTCCTTCATGGAGACCTTAC	CACGGAAGTAGGCAGAGCAGGT	CAGGTAGCGACC	GTTGC					
SZMC 13070	GCGCTTGCAATCAGCAAAAGAGGCGCATCTGGTCCTCAACCTCCTTCATAGAGACCTTAC	CACGGAAGTAGGCAGAGCAGGT	CAGGTAGCGACC	GTTGC						
SZMC 13071	GCGCTTGCAATCAGCAAAAGAG									
SZMC 13073	GCGCTTGCAATCAGCAAAAGAGGCGCATCTGGTCCTCAACCTCCTTCATGGAGACCTTAC	CACGGAAGTAGGCAGAGCAGGT	CAGGTAGCGACC	GTTGC						
SZMC 13074	GCGCTTGCAATCAGCAAAAGAG								GCGACC	GTTGC
SZMC 13075	GCGCTTGCAATCAGCAAAAGAG	GCGCATCTGGTCCTCAACCTCCTTCATGGAGACCTTAC	CCCGGATGTAGGCAGAGCAGGT	CAGGTAGCGACC	GTTGC					
SZMC 13063	GCGCTTGCAATCAGCAAAAGAG	GCATTTGGTTCCTCAACCTCCTTCATGGAGACCTTAC	CACGGAAGTAGGCAGAGCAGGT	CAGGTAGCGACC	GTTGC					
SZMC 13078	GCGCTTGCAATCAGCAAAAGAG									
SZMC 13079	GCGCTTGCAATCAGCAAAAGAGGCGCATCTGGTCCTCAACCTCCTTCATGGAGACCTTAC	CACGGAAGTAGGCAGAGCAGGT	CAGGTAGCGACC	GTTGC						
SZMC 13080	GCGCTTGCCATCAGCAAAAGAG									
SZMC 21169	GCGCTTGCCATCAGCAAAAGAG									
SZMC 13081 B.spicifera		GCGCATCTGGTCCTCAACCTCCTTCATGGAGACCTTAC	CACGGAAGTAGGCAGAGCAGGT	CAGGTAGCGACC	GTTGC					
SZMC 13082 B.spicifera*										
SZMC 13083 B.hawaiiensis	GCGCTTGCAATCAGCAAAAGAGGCGCATCTGGTCCTCAACCTCCTTCATGGAGACCTTAC	CACGGAAGTAGGCAGAGCAGGT	CAGGTAGCGACC	GTTGC						
SZMC 13084 B.hawaiiensis	GCGCTTGCAATCAGCAAAAGAG	GCGCATCTGGTCCTCAACCTCCTTCATGGAGACCTTAC	CTCGGAAGTAGGTGAGCAGGT	CAGGTAGCGACC	GTTGC					
SZMC 13085 B.hawaiiensis*	GCGCTTGCAATCAGCAAAAGAGGCGCATCTGGTCCTCAACCTCCTTCATGGAGACCTTAC	CACGGAAGTAGGCAGAGCAGGT	CAGGTAGCGACC	GTTGC						
SZMC 13086 B.australiensis*	GCGCTTGCAATCAGCAAAAGAGGCGCATCTGGTCCTCAACCTCCTTCATGGAGACCTTAC	CACGGAAGTAGGCAGAGCAGGT	CAGGTAGCGACC	GTTGC						
SZMC 13087 B.australiensis	GCGCTTGCAATCAGCAAAAGAGGCGCATCTGGTCCTCAACCTCCTTCATGGAGACCTTAC	CACGGAAGTAGGCAGAGCAGGT	CAGGTAGCGACC	GTTGC						
SZMC 13088 B.spicifera	GCGCTTGCAATCAGCAAAAGAGGCGCATCTGGTCCTCAACCTCCTTCATCGAGACCTTAC	CGCGGAAGTAGGCAGAGCAGGT	CAGGTAGCGACC	GTTGC						
SZMC 13041 Co.australiensis	GCGCTTGCAATCAGCAAAAGAGGCGCATCTGGTCCTCAACCTCCTTCATGGAGACCTTAC	CACGGAAGTAGGCAGAGCAGGT	CAGGTAGCGACC	GTTGC						
SZMC 13042 Co.hawaiiensis		CTCTGGTCCTCAACCTCCTTCATGGAGACCTTAT	CACGGAAGTAGGCAGAGCAGGT	CAGGTAGCGACC	GTTGC					
SZMC 13044 Co.australiensis		GCGCATCTGGTCCTCAACCTCCTTCATGGAGACCTTAC	CACGGAAGTAGGCAGAGCAGGT	CAGGTAGCGACC	GTTGC					
SZMC 13056 Co.hawaiiensis	GCGCTTGCAATCAGCAAAAGAG									
SZMC 13057 Co.spicifer	GCGCTTGCAATCAGCAAAAGAG	CTCTGGTCCTCAACCTCCTTCATGGAGACCTTAT	CACGGAAGTAGGCAGAGCAGGT	CAGGTAGCGACC	GTTGC					
SZMC 13012 B.sorokiniana	GCGCTTTGTATCAGGAGAAAAAG									

	1310	1320	1330	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400	
SZMC 13058										TAAG
SZMC 13059	GGAAAGTCGGAGGCAGCCATCATGTTCTTTGGGGTCGAACATTTGCTGGGTAGCTCGGGAACGGTGACGGCGCGGAAGGAGTGGGCGCCACGGCTGGTAAG										
SZMC 13060	GGAAAGTCGGAGGCAGCCATCATGTTCTTTGGGGTCGAACATTTGCTGGGTAGCTCGGGAACGGTGACGGCGCGGAAGGAGTGGGCGCCACGGCTGGTAAG										
SZMC 13061	GGAAAGTCGGAGGCAGCCATCAT-TTCTTTGGGGTCGAACATTAGCTGGGTAGCTCGGGAACGGTGACGGCGCGGAAGGAGTGGGCGCCAGGGCTGGTAAG										
SZMC 13062	GGAAAGTCGGAGGCAGCCATCATGTTCTTTGGGGTCGAACATTTGCTGGGTAGCTCGGGAACGGTGACGGCGCGGAAGGAGTGGGCGCCACGGCTGGTAAG										
SZMC 13064	-----										
SZMC 13065	GGAAAGTCGGAGGCAGCCATCATGTTCTTTGGGGTCGAACATTTGCTGGGTAGCTCGGGAACGGTGACGGCGCGGAAGGAGTGGGCGCCACGGCTGGTAAG										
SZMC 13066	GGAAAGTCGGAGGCAGCCATCATGTTCTTTGGGGTCGAACATTTGCTGGGTAGCTCGGGAACGGTGACGGCGCGGAAGGAGTGGGCGCCACGGCTGGTAAG										
SZMC 13067	-----										GGCCCCACGGGTGGTAAG
SZMC 13068	-----										
SZMC 13069	GGAAAGTCGGAGGCAGCCATCATGTTCTTTGGGGTCGAACATTTGCTGGGTAGCTCGGGAACGGTGACGGCGCGGAAGGAGTGGGCGCCACGGCTGGTAAG										
SZMC 21168	GGAAAGTCGGAGGCAGCCATCATGTTCTTTGGGGTCGAACATTTGCTGGGTAGCTCGGGAACGGTGACGGCGCGGAAGGAGTGGGCGCCACGGCTGGTAAG										
SZMC 13070	GGAAAGTCGGAGGCAGCCATCATGTTCTTTGGGGTCGAACATTTGCTGGGTAGCTCGGGAACGGTGACGGCGCGGAAGGAGTGGGCGCCACGGCTGGTAAG										
SZMC 13071	-----										
SZMC 13073	GGAAAGTCGGAGGCAGCCATCATGTTCTTTGGGGTCGAACATTTGCTGGGTAGCTCGGGAACGGTGACGGCGCGGAAGGAGTGGGCGCCACGGCTGGTAAG										
SZMC 13074	GGAAAGTCGGAGGCAGCCATCATGTTCTTTGGGGTCGAACATTTGCTGGGTAGCTCGGGAACGGTGACGGCGCGGAAGGAGTGGGCGCCACGGCTGGTAAG										
SZMC 13075	GGAAAGTCGGAGGCAGCCATCATGTTCTTTGGGGTCGAACATTTGCTGGGTAGCTCGGGAACGGTGACGGCGCGGAAGGAGTGGGCGCCACGGCTGGTAAG										
SZMC 13063	GGAAAGTCGGAGGCAGCCATCAT-TTCTTTGGGGTCGAACATTTGCTGGGTAGCTCGGGAACGGTGACGGCGCGGAAGGAGTGGGCGCCACGGCTGGTAAG										
SZMC 13078	-----										C-TCCCGGCTGGTAAG
SZMC 13079	GGAAAGTCGGAGGCAGCCATCATGTTCTTTGGGGTCGAACATTTGCTGGGTAGCTCGGGAACGGTGACGGCGCGGAAGGAGTGGGCGCCACGGCTGGTAAG										
SZMC 13080	-----										
SZMC 21169	-----										
SZMC 13081 B.spicifera	GGAAAGTCGGAGGCAGCCATCATGTTCTTTGGGGTCGAACATTTGCTGGGTAGCTCGGGAACGGTGACGGCGCGGAAGGAGTGGGCGCCACGGCTGGTAAG										
SZMC 13082 B.spicifera*	-----										
SZMC 13083 B.hawaiiensis	GGAAAGTCGGAGGCAGCCATCATGTTCTTTGGGGTCGAACATTTGCTGGGTAGCTCGGGAACGGTGACGGCGCGGAAGGAGTGGGCGCCACGGCTGGTAAG										
SZMC 13084 B.hawaiiensis	GGAAAGTCGGAGGCAGCCATCATGTTCTTTGGGGTCGAACATTTGCTGGGTAGCTCGGGAACGGTGACGGCGCGGAAGGAGTGGGCGCCACGGCTGGTAAG										
SZMC 13085 B.hawaiiensis*	GGAAAGTCGGAGGCAGCCATCATGTTCTTTGGGGTCGAACATTTGCTGGGTAGCTCGGGAACGGTGACGGCGCGGAAGGAGTGGGCGCCACGGCTGGTAAG										
SZMC 13086 B.australiensis*	GGAAATTCGGAGGCAGCCATCATGTTCTTTGGGGTCGAACATTTGCTGGGTAGCTCGGGAACGGTGACGGCGCGGAAGGAGTTGGCGCCACGGCTGGTAAG										
SZMC 13087 B.australiensis	GGAAAGTCGGAGGCAGCCATCATGTTCTTTGGGGTCGAACATTTGCTGGGTAGCTCGGGAACGGTGACGGCGCGGAAGGAGTGGGCGCCACGGCTGGTAAG										
SZMC 13088 B.spicifera	GGAAAGTCGGAAGCAGCCATCATGTTCTTTGGGGTCGAACATTTGCTGGGTAGCTCGGGAACGGTGACGGCGCGGAAGGAGTGGGCGCCACGGCTGGTAG										
SZMC 13041 Co.australiensis	GGAAATTCGGAGGCAGCCATCATGTTCTTTGGGGTCGAACATTTGCTGGGTAGCTCGGGAACGGTGACGGCGCGGAAGGAGTTGGCGCCACGGCTGGTAAG										
SZMC 13042 Co.hawaiiensis	GGAAAGTCGGAGGCAGCCATCATGTTCTTTGGGGTCGAACATTTGCTGGGTAGCTCGGGAACGGTGACGGCGCGGAAGGAGTGGGCGCCACGGCTGGCAAG										
SZMC 13044 Co.australiensis	GGAAAGTCGGAGGCAGCCATCATGTTCTTTGGGGTCGAACATTTGCTGGGTAGCTCGGGAACGGTGACGGCGCGGAAGGAGTGGGCGCCACGGCTGGTAAG										
SZMC 13056 Co.hawaiiensis	GGAAAGTCGGAGGCAGCCATCATGTTCTTTGGGGTCGAACATTTGCTGGGTAGCTCGGGAACGGTGACGGCGCGGAAGGAGTGGGCGCCACGGCTGGTAAG										
SZMC 13057 Co.spicifer	GGAAAGTCGGAGGCAGCCATCATGTTCTTTGGGGTCGAACATTTGCTGGGTAGCTCGGGAACGGTGACGGCGCGGAAGGAGTGGGCGCCACGGCTGGCAAG										
SZMC 13012 B.sorokiniana	-----										

[illegible]

	1510	1520	1530	1540	1550	1560	1570	1580	1590	1600
									
SZMC 13058	CAGGTGGTGA	CACCCGACATGACGGCGGAGACGAGGTGGTTCAGGTCACCGTACGAGGGGTTGTT	CAGCTTGAGGGTCCTCATGCAAATGTCGTAGAGAG							
SZMC 13059	CAGGTGGTGA	CACCCGACATGACGGCGGAGACGAGGTGGTTCAGGTCGCGTAAGAGGGGTTGTT	CAGCTTGAGGGTCCTCATGCAAATGTCGTAGAGAG							
SZMC 13060	CAGGTGGTGA	CACCCGACATGACGGCGGAGACGAGGTGGTTCAGGTCACCGTACGAGGGGTTGTT	CAGCTTGAGGGTCCTCATGCAAATGTCGTAGAGAG							
SZMC 13061	CAGGTGGTGA	CACCCGACATGACGGCGGAGACGAGGTGGTTCAGGTCACCGTACGAGGGGTTGTT	CAGCTTGAGGGTCCTCATGCAAATGTCGTAGAGAG							
SZMC 13062	CAGGTGGTGA	CACCCGACATGACGGCGGAAACGAGGTGGTTCAGGTCACCGTACGAGGGGTTGTT	CAGCTTGAGGGTCCTCATGCAAATGTCGTAGAGAG							
SZMC 13064										
SZMC 13065	CAGGTGGTGA	CACCCGACATGACGGCGGAGACGAGGTGGTTCAGGTCACCGTACGAGGGGTTGTT	CAGCTTGAGGGTCCTCATGCAAATGTCGTAGAGAG							
SZMC 13066	CAGGTGGTGA	CACCCGACATGACGGCGGAGACGAGGTGGTTCAGGTCACCGTACGAGGGGTTGTT	CAGCTTGAGGGTCCTCATGCAAATGTCGTAGAGAG							
SZMC 13067	CAGGTGGTGA	CACCCGACATGACGGCGGAGACGAGGTGGTTCAGGTCACCGTACGAGGGGTTGTT	CAGCTTGAGGGTCCTCATGCAAATGTCGTAGAGAG							
SZMC 13068										
SZMC 13069	CAGGTGGTGA	CACCCGACATGACGGCGGAGACGAGGTGGTTCAGGTCACCGTACGAGGGGTTGTT	CAGCTTGAGGGTCCTCATGCAAATGTCGTAGAGAG							
SZMC 21168	CAGGTGGTGA	CACCCGACATGACGGCGGAAACGAGGTGGTTCAGGTCACCGTACGAGGGGTTGTT	CAGCTTGAGGGTCCTCATGCAAATGTCGTAGAGAG							
SZMC 13070	CAGGTGGTGA	CACCCGACATGACGGCGGAGACGAGGTGGTTCAGGTCACCGTACGAGGGGTTGTT	CAGCTTGAGGGTCCTCATGCAAATGTCGTAGAGAG							
SZMC 13071										
SZMC 13073	CAGGTGGTGA	CACCCGACATGACGGCGGAGACGAGGTGGTTCAGGTCACCGTACGAGGGGTTGTT	CAGCTTGAGGGTCCTCATGCAAATGTCGTAGAGAG							
SZMC 13074	CAGGTGGTGA	CACCCGACATGACGGCGGAGACGAGGTGGTTCAGGTCACCGTACGAGGGGTTGTT	CAGCTTGAGGGTCCTCATGCAAATGTCGTAGAGAG							
SZMC 13075	CAGGTGGTGA	CACCCGACATGACGGTGGAGACGAGGTGGTTCAGGTCACCGTACGAGGGGTTGTT	CAGCTTGAGGGTCCTCATGCAAATGTCGTAGAGAG							
SZMC 13063	CAGGTGGTGA	CACCCGACATGACGGCGGAGACGAGGTGGTTCAGGTCACCGTACGAGGGGTTGTT	CAGCTTGAGGGTCCTCATGCAAATGTCGTAGAGAG							
SZMC 13078	CAGGTGGTGA	CACCCGACATGACGGCGGAGACGAGGTGGTTCAGGTCACCGTACGAGGGGTTGTT	CAGCTTGAGGGTCCTCATGCAAATGTCGTAGAGAG							
SZMC 13079	CAGGTGGTGA	CACCCGACATGACGGCGGAGACGAGGTGGTTCAGGTCACCGTACGAGGGGTTGTT	CAGCTTGAGGGTCCTCATGCAAATGTCGTAGAGAG							
SZMC 13080										
SZMC 21169										
SZMC 13081 B.spicifera	CAGGTGGTGA	CACCCG								
SZMC 13082 B.spicifera*										
SZMC 13083 B.hawaiiensis	CAGGTGGTGA	CACCCGACATGACGGCGGAGACGAGGTGGTTCAGGTCACCGTACGAGGGGTTGTT	CAGCTTGAGGGTCCTCATGCAAATGTCGTAGAGAG							
SZMC 13084 B.hawaiiensis	CAGGTGGTGA	CACCCGACATGACGGCGGAGACGAGGTGGTTCAGGTCACCGTACGAGGGGTTGTT	CAGCTTGAGGGTCCTCATGCAAATGTCGTAGAGAG							
SZMC 13085 B.hawaiiensis*	CAGGTGGTGA	CACCCGACATGACGGCGGAGACGAGGTGGTTCAGGTCACCGTACGAGGGGTTGTT	CAGCTTGAGGGTCCTCATGCAAATGTCGTAGAGAG							
SZMC 13086 B.australiensis*	CAGGTGGTGA	CACCCGACATGACGGCGGAGACGAGGTGGTTCAGGTCACCGTACGAGGGGTTGTT	CAGCTTGAGGGTCCTCATGCAAATGTCGTAGAGAG							
SZMC 13087 B.australiensis	CAGGTGGTGA	CACCCGACATGACGGCGGAGACGAGGTGGTTCAGGTCACCGTACGAGGGGTTGTT	CAGCTTGAGGGTCCTCATGCAAATGTCGTAGAGAG							
SZMC 13088 B.spicifera	CAGGTGGTGA	CACCCGACATGACGGCGGAGACGAGGTGGTTCAGGTCACCGTAGGAAGGGTTGTT	CAGCTTGAGGGTCCTCATGCAGATGTCGTAGAGAG							
SZMC 13041 Co.australiensis	CAGGTGGTGA	CACCCGACATGACGGCGGAGACGAGGTGGTTCAGGTCACCGTACGAGGGGTTGTT	CAGCTTGAGGGTCCTCATGCAAATGTCGTAGAGAG							
SZMC 13042 Co.hawaiiensis	CAGGTGGTGA	CACCCGACATGACGGCGGAGACGAGGTGGTTCAGGTCACCGTACGAGGGGTTGTT	CAGCTTGAGGGTCCTCATGCAAATGTCGTAGAGAG							
SZMC 13044 Co.australiensis	CAGGTGGTGA	CACCCGACATGACGGCGGAGACGAGGTGGTTCAGGTCACCGTACGAGGGGTTGTT	CAGCTTGAGGGTCCTCATGCAAATGTCGTAGAGAG							
SZMC 13056 Co.hawaiiensis	CAGGTGGTGA	CACCCGACATGACGGCGGAGACAAAGGTGGTTCAGGTCACCGTACGAGGGGTTGTT	CAGCTTGAGGGTCCTCATGCAAATGTCGTAGAGAG							
SZMC 13057 Co.spicifer	CAGGTGGTGA	CACCCGACATGACGGCGGAGACGAGGTGGTTCAGGTCACCGTACGAGGGGTTGTT	CAGCTTGAGGGTCCTCATGCAAATGTCGTAGAGAG							
SZMC 13012 B.sorokiniana										

	1610	1620	1630	1640	1650	1660	1670	1680	1690	1700	
SZMC 13058	CCTCGTTGTC	CAATGCAGAAGGTCTCAT	CGGAGTTCTCAACCAGCTGGTGGATGGAGAGTGTGGCGTTGTAGGGCTCGACGACGGTGT	CGGAGACCTTGGG						
SZMC 13059		CCTCGTTGTC	CAATGCAGAAGGTCTCGT	CAGAGTTCTCAACCAGCTGGTGGATCGAGAGTGTGGCGTTGTAGGGCTCGACAAACGGTGT	CGGAGACCTTGGG						
SZMC 13060		CCTCGTTGTC	CAATGCAGAAGGTCTCAT	CGGAGTTCTCAACCAGTTGGTGGATGGAGAGTGTGGCGTTGTAGGGCT							
SZMC 13061		CCTCGTTGTC	CAATGCAGAAGGTCTCAT	CGGAGTTCTCAACCAGCTGGTGGATGGAGAGTGTGGCGTTGTAGGGCTCGACAAACGGTGT	CGGAGACCTTGGG						
SZMC 13062		CCTCGTTGTC	CAATGCAGAAGGTCTCGT	CAGAGTTCTCAACCAGCTGGTGGATGGAGAGTGTGGCGTTGTAGGGCTCGACAAACGGTGT	CGGAGACCTTGGG						
SZMC 13064											
SZMC 13065		CCTCGTTGTC	CAATGCAGAAGGTCTCAT	CGGAGTTCTCAACCAGCTGGTGGATGGAGAGTGTGGCGTTGTAGGGCTCGACAAACGGTGT	CGGAGACCTTGGG						
SZMC 13066		CCTCGTTGTC	CAATGCAGAAGGTCTCAT	CGGAGTTCT							
SZMC 13067		CCTCGTTGTC	CAATGCAGAAGGTCTCAT	CGGAGTTCTCAACCAGCTGGTGGATGGAGAGTGTGGCGTTGTAGGGCTCGACAAACGGTGT	CGGAGACCTTGGG						
SZMC 13068											
SZMC 13069		CCTCGTTGTC	CAATGCAGAAGGTCTCAT	CGGAGTTCT							
SZMC 21168		CCTCGTTGTC	CAATGCAGAAGGTCTCGT	CAGAGTTCTCAACCAGCTGGTGGATGGAGAGTGTGGCGTTGTAGGGCTCGACAAACGGTGT	CGGAGACCTTGGG						
SZMC 13070		CCTCGTTGTC	CAATGCAGAAGGTCTCAT	CGGAGTTCTCAACCAGCTGGTGGATGGAGAGTGTGGCGTTGTAGGGCTCGACAAACGGTGT	CGGAGACCTTGGG						
SZMC 13071											
SZMC 13073		CCTCG	TGTC	CAATGCAGAAGGTCTCAT	CGGAGTTCTCAACCAGCTGGTGGATGGAGAGTGTGGCGTTGTAGGGCTCGACGACGGTGT	CGGAGACCTTGGG					
SZMC 13074		CCTCGTTGTC	CAATGCAGAAGGTCTCAT	CGGAGTTCTCAACCAGTTGGTGGATGGAGAGTGTGGCGTTGTAGGGCTCGACAAACGGTGT	CGGAGACCTTGGG						
SZMC 13075		CCTCGTTGTC	CAATGCAGAAGGTCTCAT	CGGAGTTCTCAACCAGCTGGTGGATGGAGAGTGTGGCGTTGTACGGCTCGACGACGGTGT	CGGAGACCTTGGG						
SZMC 13063		CCTAGTTGTC	CAATGCAGAAGGTCTCAT	CGGAGTTCTCAACCAGTTGGTGGATGGAGAGTGTGGCGTTGTAGGGCTCGACAAACGGTGT	CGGAGACCTTGGG						
SZMC 13078		CCTCGTTGTC	CAATGCAGAAGGTCTCAT	CGGAGTTCTCAACCAGTTGGTGGATGGAGAGTGTGGCGTTGTAGGGCTC							
SZMC 13079		CCTCGTTGTC	CAATGCAGAAGGTCTCAT	CGGAGTTCTCAACCAGCTGGTGGATGGAGAGTGTGGCGTTGTAGGGCTC							
SZMC 13080											
SZMC 21169											
SZMC 13081 B.spicifera											
SZMC 13082 B.spicifera*											
SZMC 13083 B.hawaiiensis		CCTCGTTGTC	CAATGCAGAAGGTCTCAT	CGGAGTTCTCAACCAGCTGGTGGATGGAGAGTGTGGCGTTGTAGGGCTCGACAAACGGTGT	CGGAGACCTTGGG						
SZMC 13084 B.hawaiiensis		CCTCGTTGTC	CAATGCAGAAGGTCTCAT	CGGAGTTCTCAACCAGCTGGTGGATGGAGAGTGTGGCGTTGTAGGGCTCGACAAACGGTGT	CGGAGACCTTGGG						
SZMC 13085 B.hawaiiensis*		CCTCGTTGTC	CAATGCAGAAGGTCTCAT	CGGAGTTCTCAACCAGCTGGTGGATGGAGAGTGTGGCGTTGTAGGGCTCGACAAACGGTGT	CGGAGACCTTGGG						
SZMC 13086 B.australiensis*		CCTCGTTGTC	CAATGCAGAAGGTCTCGT	CGGAGTTTCAACCAGCTGGTGGATGGAGAGTGTGGCGTTGTAGGGCTCGACAAACGGTGT	CGGAGACCTTGGG						
SZMC 13087 B.australiensis		CCTCGTTGTC	CAATGCAGAAGGTCTCAT	CGGAGTTCTCAACCAGCTGGTGGATGGAGAGTGTGGCGTTGTAGGGCTCGACGACGGTGT	CGGAGACCTTGGG						
SZMC 13088 B.spicifera		CCTCGTTGTC	CAATGCAGAAGGTCTCGT	CGGAGTTCTCAACCAGCTGGTGGATGGAGAGTGTGGCGTTGTAGGGCTCGACAAACGGTGT	CGGAGACCTTGGG						
SZMC 13041 Co.australiensis		CCTCGTTGTC	CAATGCAGAAGGTCTCGT	CGGAGTTCTCAACCAGCTGGTGGATGGAGAGTGTGGCGTTGTAGGGCTCGACAAACGGTGT	CGGAGACCTTGGG						
SZMC 13042 Co.hawaiiensis		CCTCGTTGTC	CAATGCAGAAGGTCTCAT	CGGAGTTCTCAACCAGCTGGTGGATGGAGAGTGTGGCGTTGTAGGGCTCGACAAACGGTGT	CGGAGACCTTGGG						
SZMC 13044 Co.australiensis		CCTCGTTGTC	CAATGCAGAAGGTCTCGT	CGGAGTTCTCAACCAGCTGGTGGATGGAGAGTGTGGCGTTGTAGGGCTCGACAAACGGTGT	CGGAGACCTTGGG						
SZMC 13056 Co.hawaiiensis		CCTCGTTGTC	CAATGCAGAAGGTCTCAT	CGGAGTTTCAACCAGCTGGTGGATGGAGAGTGTGGCGTTGTAGGGCTCGACAAACGGTGT	CGGAGACCTTGGG						
SZMC 13057 Co.spicifer		CCTCGTTGTC	CAATGCAGAAGGTCTCAT	CGGAGTTCTCAACCAGCTGGTGGATGGAGAGTGTGGCGTTGTAGGGCTCGACAAACGGTGT	CGGAGACCTTGGG						
SZMC 13012 B.sorokiniana											

	1710	1720	1730	1740	1750	1760	1770	1780	1790	1800
SZMC 13058	GGAGGG	CACAACCGAGTAGG	TGGCCATCATGCGGT	CGGGGAACTCCT	CACGGATCTT	GGAAATGAGAAGCGTT	CCCATACCGG	CACCAAGTACC	ACCACCG	
SZMC 13059	GGAGGG	CACAACCGAGTAGG	TGGCCATCATGCGGT	CGGGGAACTCCT	CACGGATCTT	GGAAATGAGAAGCGTT	CCCATACCGG	CACCAAGTACC	ACCACCG	
SZMC 13060										
SZMC 13061	GGAGGG	CACAACCGAGTAGG	TGGCCATCATGCGGT	CGGGGAACTCCT	CACGGATCTT	GGAAATGAGAAGCGTT	CCCATACCGG	CACCAAGTACC	ACCACCG	
SZMC 13062	AGAGGG	CACGACCGAGTAGG	TGGCCATCATGCGGT	CGGGGAACTCCT	CACGGATCTT	GGAAATGAGAAGCGTT	CCCATACCGG	CACCAAGTACC	ACCACCG	
SZMC 13064										
SZMC 13065	GGAGGG	CACAACCGAGTAGG	TGGCCATCATGCGGT	CGGGGAACTCCT	CACGAATCTT	GGAAATGAGAAGCGTT	CCCATACCGG	CACCAAGTACC	ACCACCG	
SZMC 13066										
SZMC 13067	GGAGGG	CACAACCGAGTAGG	TGGCCATCATGCGGT	CGGG						
SZMC 13068										
SZMC 13069										
SZMC 21168	AGAGGG	CACGACCGAGTAGG	TGGCCATCATGCGGT	CGGGGAACTCCT	CACGGATCTT	GGAAATGAGAAGCGTT	CCCATACCGG	CACCAAGTACC	ACCACCG	
SZMC 13070	GGAGGG	CACAACCGAGTAGG	TGGCCATCATGCGGT	CGGGGAACTCCT	CACGAATCTT	GGAAATGAGAAGCGTT	CCCATACCGG	CACCAAGTACC	ACCACCG	
SZMC 13071										
SZMC 13073	GGAGGG	CACAACCGAGTAGG	TGGCCATCATGCGGT	CGGGGAACTCCT	CACGGATCTT	GGAAATGAGAAGCGTT	CCCATACCGG	CACCAAGTACC	ACCACCG	
SZMC 13074	GGAGGG	CACAACCGAGTAGG	TGGCCATCATGCGGT	CGG						
SZMC 13075	GGAGGG	CACAACCGAGTAGG	TGGCCATCATGCGGT	CGGGGAACTCCT	CACGGATCTT	GGAAATGAGAAGCGTT	CCCATACCGG	CACCAAGTACC	ACCACCG	
SZMC 13063	GGAGGG	CACAACCGAGTAGG	TGGCCATCATGCGGT	CGG						
SZMC 13078										
SZMC 13079	GGAGGG	CACAACCGAGTAGG	TGGCCATCATGCGGT	CGGGGAACTCCT	CACGGATCTT	GGAAATGAGAAGCGTT	CCCATACCGG	CACCAAGTACC	ACCACCG	
SZMC 13080										
SZMC 21169										
SZMC 13081 B.spicifera										
SZMC 13082 B.spicifera*										
SZMC 13083 B.hawaiiensis	GGAGGG	CACAACCGAGTAGG	TGGCCATCATGCGGT	CGGGGAACTCCT	CACGGATCTT	GGAAATGAGAAGCGTT	CCCATACCGG	CACCAAGTACC	ACCACCG	
SZMC 13084 B.hawaiiensis	GGAGGG	CACAACCGAGTAGG	TGGCCATCATGCGGT	CGGGGAACTCCT	CACGGATCTT	GGAAATGAGAAGCGTT	CCCATACCGG	CACCAAGTACC	ACCACCG	
SZMC 13085 B.hawaiiensis*	GGAGGG	CACAACCGAGTAGG	TGGCCATCATGCGGT	CGGGGAACTCCT	CACGGATCTT	GGAAATGAGAAGCGTT	CCCATACCGG	CACCAAGTACC	ACCACCG	
SZMC 13086 B.australiensis*	CGAGGG	CACAACCGAGTAGG	TGGCCATCATGCGGT	CGGGGAACTCCT	CACGGATCTT	GGAAATGAGAAGCGTT	CCCATACCGG	CACCAAGTACC	CCGACCG	
SZMC 13087 B.australiensis	GGAGGG	CACAACCGAGTAGG	TGGCCATCATGCGGT	CGGGGAACTCCT	CACGGATCTT	GGAAATGAGAAGCGTT	CCCATACCGG	CACCAAGTACC	ACCACCG	
SZMC 13088 B.spicifera	CGAGGG	CACAACAGAGTATG	TGGCCATCATGCGGT	CGGGGAACTCCT	CACGGATCTT	GGAAATGAGAAGCGTT	CCCATACCGG	CACCGGTACC	ACCACCG	
SZMC 13041 Co.australiensis	CGAGGG	CACAACCGAGTAGG	TGGCCATCATGCGGT	CGGGGAACTCCT	CACGGATCTT	GGAAATGAGAAGCGTT	CCCATACCGG	CACCAAGTACC	CCGACCG	
SZMC 13042 Co.hawaiiensis	GGAGGG	CACAACCGAGTAGG	TGGCCATCATGCGGT	CGGGGAACTCCT	CACGGATCTT	GGAAATGAGAAGCGTT	CCCATACCGG	CACCAAGTACC	ACCACCG	
SZMC 13044 Co.australiensis	CGAGGG	CACAACCGAGTAGG	TGGCCATCATGCGGT	CGGGGAACTCCT	CACGGATCTT	GGAAATGAGAAGCGTT	CCCATACCGG	CACCAAGTACC	CCGACCG	
SZMC 13056 Co.hawaiiensis	GGAAAG	CACAACCGAGTAGG	TGGCCATCATGCGGT	CGGGGAACTCCT	CACGAATCTT	GGAAATGAGAAGCGTT	CCCATACCGG	CACCAAGTACC	ACCACCG	
SZMC 13057 Co.spicifer	GGAGGG	CACAACCGAGTAGG	TGGCCATCATGCGGT	CGGGGAACTCCT	CACGGATCTT	GGAAATGAGAAGCGTT	CCCATACCGG	CACCAAGTACC	ACCACCG	
SZMC 13012 B.sorokiniana										

[illegible]

	1910	1920	1930	1940	1950	1960	1970	1980	1990	2000
SZMC 13058	00010000000001000001000100000000	G	CACCAGT	TCGGATAC	GAA	TAGGCCTT	CTGGCCCAGAACCTT	ACCAGGCCGGCAT	GGGCAGTCT	CATTGA
SZMC 13059	00010001000000001001010000000000									
SZMC 13060	00010000100000000001000100000000	G	CACCAGT	TCGGATAC	GAA	TAGGCCTT	CTGGCCCAGAACCTT	ACCAGGCCGGCAT	GGGCAGTCT	CATTGA
SZMC 13061								GGC	GGCAT	GGGCAGTCTCATTGA
SZMC 13062	000101000000000000000001000001000G	CACCAGT	TCGGATAC	GAA	TAGGCCTT	CTGGCCCAGAACCTT	ACCAGGCCGGCAT	GGGCAGTCT	CATTGA	
SZMC 13064	0000000000000000000001000000110000G	CACCAGT	TCGGATAC	GAA	TAGGCCTT	CTGGCCCAGAACCTT	ACCAGGCCGGCAT	GGGCAGTCT	CATTGA	
SZMC 13065	010000101000000000001001000110000G	CACCAGT	TCGGATAC	GAA	TAGGCCTT	CTGGCCCAGAACCTT	ACCAGGCCGGCAT	GGGCAGTCT	CATTGA	
SZMC 13066								G	CACCAGT	TCGGATACGAA
SZMC 13067	01000000000000001001000100100000									
SZMC 13068										
SZMC 13069										
SZMC 21168	0011010000000000000000010000001000G	CACCAGT	TCGGATAC	GAA	TAGGCCTT	CTGGCCCAGAACCTT	ACCAGGCCGGCAT	GGGCAGTCT	CATTGA	
SZMC 13070	00000000000000000000000000000000G	CACCAGT	TCGGATAC	GAA	TAGGCCTT	CTGGCCCAGAACCTT	ACCAGGCCGGCAT	GGGCAGTCT	CATTGA	
SZMC 13071	00010000000000000000000000000000G	CACCAGT	TCGGATAC	GAA	TAGGCCTT	CTGGCCCAGAACCTT	ACCAGGCCGGCAT	GGGCAGTCT	CATTGA	
SZMC 13073	0000000000000000000000001001000000G	C	CCAGT	TCGGATAC	GAA	TAGGCCTT	CTGGCCCAGAACCTT	ACCAGGCCGGCAT	GGGCAGTCT	CATTGA
SZMC 13074	00000000000000000000000000000000G	CACCAGT	TCGGATAC	GAA	TAGGCCTT	CTGGCCCAGAACCTT	ACCAGGCCGGCAT	GGGCAGTCT	CATTGA	
SZMC 13075	0100000000000000000000000101000000									
SZMC 13063	010000000110000000001001100100000G	CACCAGT	TCGGATAC	GAA	TAGGCCTT	CTGGCCCAGAACCTT	ACCAGGCCGGCAT	GGGCAGTCT	CATTGA	
SZMC 13078	01000000000000000000000000000000G	CACCAGT	TCGGATAC	GAA	TAGGCCTT	CTGGCCCAGAACCTT	ACCAGGCCGGCAT	GGGCAGTCT	CATTGA	
SZMC 13079	01000000000000000000000000000000G	CACCAGT	TCGGATAC	GAA	TAGGCCTT	CTGGCCCAGAACCTT	ACCAGGCCGGCAT	GGGCAGTCT	CATTGA	
SZMC 13080	10000000000000000000000000000000G	CAC	AGT	TCGGATAC	GAA	TAGGCCTT	CTGGCCCAGAACCTT	ACCAGGCCGGCAT	GGGCAGTCT	CATTGA
SZMC 21169	10000000000000000000000000000000G	CACCAGT	TCGGATAC	GAA	TAGGCCTT	CTGGCCCAGAACCTT	ACCAGGCCGGCAT	GGGCAGTCT	CATTGA	
SZMC 13081 B.spicifera	00010000010001001001000101011000G	CACCAGT	TCGGATAC	GAA	TAGGCCTT	CTGGCCCAGAACCTT	ACCAGGCCGGCAT	GGGCAGTCT	CATTGA	
SZMC 13082 B.spicifera*	00000000000001001000000101011000									
SZMC 13083 B.hawaiiensis	00000000100000000101000000101000G	CACCAGT	TCGGATAC	GAA	TAGGCCTT	CTGGCCCAGAACCTT	ACCAGGCCGGCAT	GGGCAGTCT	CATTGA	
SZMC 13084 B.hawaiiensis	00000000100000000101000000100000G	CACCAGT	TCGGATAC	GAA	TAGGCCTT	CTGGCCCAGAACCTT	ACCAGGCCGGCAT	GGGCAGTCT	CATTGA	
SZMC 13085 B.hawaiiensis*	00000000100000000101000000100000G	CACCAGT	TCGGATAC	GAA	TAGGCCTT	CTGGCCCAGAACCTT	ACCAGGCCGGCAT	GGGCAGTCT	CATTGA	
SZMC 13086 B.australiensis*	0000000001100000100000000001000000									
SZMC 13087 B.australiensis	00000000000001000000000000010000G	CACCAGT	TCGGATAC	GAA	TAGGCCTT	CTGGCCCAGAACCTT	ACCAGGCCGGCAT	GGGCAGTCT	CATTGA	
SZMC 13088 B.spicifera	00001000000100000000010100000000G	CACCAGT	TCGGATAC	GAA	TAGGCCTT	CTGGCCCAGAACCTT	ACCAGGCCGGCAT	GGGCAGTCT	CATTGA	
SZMC 13041 Co.australiensis	00000000000001010100000000000000G	CACCAGT	TCGGATAC	GAA	TAGGCCTT	CTGGCCCAGAACCTT	ACCAGGCCGGCAT	GGGCAGTCT	CATTGA	
SZMC 13042 Co.hawaiiensis	1010000000000100000001000000110000									
SZMC 13044 Co.australiensis	0000000000000000010010000100000000									
SZMC 13056 Co.hawaiiensis	1010000000000100000001000000110000G	CACCAGT	TCGGATAC	GAA	TAGGCCTT	CTGGCCCAGAACCTT	ACCAGGCCGGCAT	GGGCAGTCT	CATTGA	
SZMC 13057 Co.spicifer	00000010000000100010000000000000									
SZMC 13012 B.sorokiniana	00001000000000000000000000000000									

		2110	2120	2130	2140	2150	2160	2170	2180	2190	2200	
SZMC 13058		
SZMC 13059		TAGCCTT	GTTGTTACGAGCTATTGAGCGTAAGCCCGTCGCTAGCCTTGGTTGAAATTGGGAATAATACCCTCCCCGTTTGTGGAAGAGTGGCCTTGAATGAG									
SZMC 13060		TAGCCTT	GTTGTTACGAGCTATTGAGCGTAAGCCCGTCGCTAGCCTTGGTTGAAATTGGGAATAATACCCTCCCCGTTTGTGGAAGAGTGGCCTTCTATTAG									
SZMC 13061		TAGCCTT	GTTGTTACGAGCTATTGAGCGTAAGCCCGTCGCTAGCCTTGGTTGAAATTGGGAATAATACCCTCCCCGTTTGTGGAAGAGTGGCCTTTGATAG									
SZMC 13062		TAGCCTT	GTTGTTACGAGCTATTGAGCGTAAGCCCGTCGCTAGCCTTGGTTGAAATTGGGAATAATACCCTCCCCGTTTGTGGAAGAGTGGCCTGAATGAG									
SZMC 13064		TAGCCTT	GTTGTTACGAGCTATTGAGCGTAAGCCCGTCGCTAGCCTTGGTTGAAATTGGGAATAATACCCTCCCCGTTTGTGGAAGAGTGGCCTTCTATTAG									
SZMC 13065		TAGCCTT	GTTGTTACGAGCTATTGAGCGTAAGCCCGTCGCTAGCCTTGGTTGAAATTGGGAATAATACCCTCCCCGTTTGTGGAAGAGTGGCCTTTGACAG									
SZMC 13066		TAGCCTT	GTTGTTACGAGCTATTGAGCGTAAGCCCGTCGCTAGCCTTGGTTGAAATTGGGAATAATACCCTCCCCGTTTGTGGAAGAGTGGCCTTGAATGAG									
SZMC 13067		TAGCCTT	GTTGTTACGAGCTATTGAGCGTAAGCCCGTCGCTAGCCTTGGTTGAAATTGGGAATAATACCCTCCCCGTTTGTGGAAGAGTGGCCTTTGATAG									
SZMC 13068		TAGCCTT	GTTGTTACGAGCTATTGAGCGTAAGCCCGTCGCTAGCCTTGGTTGAAATTGGGAATAATACCCTCCCCGTTTGTGGAAGAGTGGCCTTCTATTAG									
SZMC 13069		TAGCCTT	GTTGTTACGAGCTATTGAGCGTAAGCCCGTCGCTAGCCTTGGTTGAAATTGGGAATAATACCCTCCCCGTTTGTGGAAGAGTGGCCTTTGATAG									
SZMC 21168		TAGCCTT	GTTGTTACGAGCTATTGAGCGTAAGCCCGTCGCTAGCCTTGGTTGAAATTGGGAATAATACCCTCCCCGTTTGTGGAAGAGTGGCCTTGAATGAG									
SZMC 13070		TAGCCTT	GTTGTTACGAGCTATTGAGCGTAAGCCCGTCGCTAGCCTTGGTTGAAATTGGGAATAATACCCTCCCCGTTTGTGGAAGAGTGGCCTTTGACAG									
SZMC 13071		TAGCCTT	GTTGTTACGAGCTATTGAGCGTAAGCCCGTCGCTAGCCTTGGTTGAAATTGGGAATAATACCCTCCCCGTTTGTGGAAGAGTGGCCTCTATTAG									
SZMC 13073		TAGCCTT	GTTGTTACGAGCTATTGAGCGTAAGCCCGTCGCTAGCCTTGGTTGAAATTGGGAATAATACCCTCCCCGTTTGTGGAAGAGTGGCCTCTATTAG									
SZMC 13074		TAGCCTT	GTTGTTACGAGCTATTGAGCGTAAGCCCGTCGCTAGCCTTGGTTGAAATTGGGAATAATACCCTCCCCGTTTGTGGAAGAGTGGCCTTTGACAG									
SZMC 13075		TAGCCTT	GTTGTTACGAGCTATTGAGCGTAAGCCCGTCGCTAGCCTTGGTTGAAATTGGGAATAATACCCTCCCCGTTTGTGGAAGAGTGGCCTTCTATTAG									
SZMC 13063		TAGCCTT	GTTGTTACGAGCTATTGAGCGTAAGCCCGTCGCTAGCCTTGGTTGAAATTGGGAATAATACCCTCCCCGTTTGTGGAAGAGTGGCCTTTGATAG									
SZMC 13078		TAGCCTT	GTTGTTACGAGCTATTGAGCGTAAGCCCGTCGCTAGCCTTGGTTGAAATTGGGAATAATACCCTCCCCGTTTGTGGAAGAGTGGCCTCTATTAG									
SZMC 13079		TAGCCTT	GTTGTTACGAGCTATTGAGCGTAAGCCCGTCGCTAGCCTTGGTTGAAATTGGGAATAATACCCTCCCCGTTTGTGGAAGAGTGGCCTTCTATTAG									
SZMC 13080		TAGCCTT	GTTGTTACGAGCTATTGAGCGTAAGCCCGTCGCTAGCCTTGGTTGAAATTGGGAATAATACCCTCCCCGTTTGTGGAAGAGTGGCCTTGAATGAG									
SZMC 21169		TAGCCTT	GTTGTTACGAGCTATTGAGCGTAAGCCCGTCGCTAGCCTTGGTTGAAATTGGGAATAATACCCTCCCCGTTTGTGGAAGAGTGGCCTCTATTAG									
SZMC 13081	B.spicifera	TAGCCTT	GTTGTTACGAGCTATTGAGCGTAAGCCCGTCGCTAGCCTTGGTTGAAATTGGGAATAATACCCTCCCCGTTTGTGGAAGAGTGGCCTTCTATTAG									
SZMC 13082	B.spicifera*	TAGCCTT	GTTGTTACGAGCTATTGAGCGTAAGCCCGTCGCTAGCCTTGGTTGAAATTGGGAATAATACCCTCCCCGTTTGTGGAAGAGTGGCCTCTATTAG									
SZMC 13083	B.hawaiiensis	TAGCCTT	GTTGTTACGAGCTATTGAGCGTAAGCCCGTCGCTAGCCTTGGTTGAAATTGGGAATAATACCCTCCCCGTTTGTGGAAGAGTGGCCTTTGATAG									
SZMC 13084	B.hawaiiensis	TAGCCTT	GTTGTTACGAGCTATTGAGCGTAAGCCCGTCGCTAGCCTTGGTTGAAATTGGGAATAATACCCTCCCCGTTTGTGGAAGAGTGGCCTTTGATAG									
SZMC 13085	B.hawaiiensis*	TAGCCTT	GTTGTTACGAGCTATTGAGCGTAAGCCCGTCGCTAGCCTTGGTTGAAATTGGGAATAATACCCTCCCCGTTTGTGGAAGAGTGGCCTTTGATAG									
SZMC 13086	B.australiensis*	TAGCCTT	GTTGTTACGAGCTATTGAGCGTAAGCCCGTCGCTAGCCTTGGTTGAAATTGGGAATAATACCCTCCCCGTTTGTGGAAGAGTGGCCTTTCTAAG									
SZMC 13087	B.australiensis	TAGCCTT	GTTGTTACGAGCTATTGAGCGTAAGCCCGTCGCTAGCCTTGGTTGAAATTGGGAATAATACCCTCCCCGTTTGTGGAAGAGTGGCCTCTATTAG									
SZMC 13088	B.spicifera	TAGCCTT	GTTGTTACGAGCTATTGAGCGTAAGCCCGTCGCTAGCCTTGGTTGAAATTGGGAATAATACCCTCCCCGTTTGTGGAAGAGTGGCCTTCTATTAG									

	2210	2220	2230	2240	2250	2260	2270	2280	2290	2300
SZMC 13058	CCGCGGCCTCAGAAGGGGAGAT	GGTACTGGTTTGATG			GAGT			TGAAGTCGAAAAATATTGTTA		
SZMC 13059										
SZMC 13060	CCGCGGCCTCAGAAGGGGAGAG	AGTAGTAGTGCGATGCTT			TTTTGAAATGGCTGTCGTATAGTAAC	TTGTGATT				
SZMC 13061	CCGCGGCCTCAGAAGGGGAGAG	AGTAGTAGTGCGATGCTT	GTAGTAGTAAGT				TGGAGTTG			
SZMC 13062	CCGCGGCCTCAGAAGGGGAGAT	GGTACTGGTTTGATG			GAGT		TGAAGTCGAAAAATATTGTTA			
SZMC 13064	CCGCGGCCTCAGAAGGGGAGAG	AGTAGTAGTGCGATGCTT			TTTTGAAATGGCTGTCGTATAGTAAC	TTGTGATT				
SZMC 13065	CCGCGGCCTCAGAAGGGGAGAG	AGTAGTAGTGCGATGCTT	GTAGTAGTAGGT				TGGAGTTG			
SZMC 13066	CCGCGGCCTCAGAAGGGGAGAT	GGTACTGGTTTGATG			GAGT		TGAAGTCGAAAAATATTGTTA			
SZMC 13067	CCGCGGCCTCAGAAGGGGAGAG	AGTAGTAGTGCGATGCTT	GTAGTAGTAGGT				TGGAGTTG			
SZMC 13068	CCGCGGCCTCAGAAGGGGAGAG	AGTAGTAGTGCGATGCTT			TTTTGAAATGGCTGTCGTATAGTAAC	TTGTGATT				
SZMC 13069	CCGCGGCCTCAGAAGGGGAGAG	AGTAGTAGTGCGATGCTT	GTAGTAGTAAGT				TGGAGTTG			
SZMC 21168	CCGCGGCCTCAGAAGGGGAGAT	GGTACTGGTTTGATG			GAGT		TGAAGTCGAAAAATATTGTTA			
SZMC 13070	CCGCGGCCTCAGAAGGGGAGAG	AGTAGTAGTGCGATGCTT	GTAGTAGTAGGT				TGGAGTTG			
SZMC 13071	CCGCGGCCTCAGAAGGGGAGAG	AGTAGTAGTGCGATGCTT			TTTTGAAATGGCTGTCGTATAGTAAC	TTGTGATT				
SZMC 13073	CCGCGGCCTCAGAAGGGGAGAG	AGTAGTAGTGCGATGCTT			TTTTGAAATGGCTGTCGTATAGTAAC	TTGTGATT				
SZMC 13074	CCGCGGCCTCAGAAGGGGAGAG	AGTAGTAGTGCGATGCTT	GTAGTAGTAGGT				TGGAGTTG			
SZMC 13075	CCGCGGCCTCAGAAGGGGAGAG	AGTAGTAGTGCGATGCTT			TTTTGAAATGGCTGTCGTATAGTAAC	TTGTGATT				
SZMC 13063	CCGCGGCCTCAGAAGGGGAGAG	AGTAGTAGTGCGATGCTT	GTAGTAGTAAGT				TGGAGTTG			
SZMC 13078	CCGCGGCCTCAGAAGGGGAGAG	AGTAGTAGTGCGATGCTT			TTTTGAAATGGCTGTCGTATAGTAAC	TTGTGATT				
SZMC 13079	CCGCGGCCTCAGAAGGGGAGAG	AGTAGTAGTGCGATGCTT			TTTTGAAATGGCTGTCGTATAGTAAC	TTGTGATT				
SZMC 13080	CCGCGGCCTCAGAAGGGGAGAT	GGTACTGGTTTGATG			GAGT		TGAAGTCGAAAAATATTGTTA			
SZMC 21169	CCGCGGCCTCAGAAGGGGAGAT	GGTACTGGTTTGATG			GAGT		TGAAGTCGAAAAATATTGTTA			
SZMC 13081 B.spicifera	CCGCGGCCTCAGAAGGGGAGAG	AGTAGTAGTGCGATGCTT			TTTTGAAATGGCTGTCGTATAGTAAC	TTGTGATT				
SZMC 13082 B.spicifera*	CCGCGGCCTCAGAAGGGGAGAG	AGTAGTAGTGCGATGCTT			TTTTGAAATGGCTGTCGTATAGTAAC	TTGTGATT				
SZMC 13083 B.hawaiiensis	CCGCGGCCTCAGAAGGGGAGAG	AGTAGTAGTGCGATGCTT	GTAGTAGTAAGT				TGGAGTTG			
SZMC 13084 B.hawaiiensis	CCGCGGCCTCAGAAGGGGAGAG	AGTAGTAGTGCGATGCTT	GTAGTAGTAAGT				TGGAGTTG			
SZMC 13085 B.hawaiiensis*	CCGCGGCCTCAGAAGGGGAGAG	AGTAGTAGTGCGATGCTT	GTAGTAGTAAGT				TGGAGTTG			
SZMC 13086 B.australiensis*	CCGCGGCCTCAAAAGGGGAGAG	GAAAGTAGTGCGATGCTT			T		AAGAGAGG			
SZMC 13087 B.australiensis	CCGCGGCCTCAGAAGGGGAGAG	AGTAGTAGTGCGATGCTT			TTTTGAAATGGCTGTCGTATAGTAAC	TTGTGATT				
SZMC 13088 B.spicifera	CCGCGGCCTCAGAAGGGGAGAG	AGTAGTAGTGCGATGCTT			TTTTGAAATGGCTGTCGTATAGTAAC	TTGTGATT				
SZMC 13041 Co.australiensis	CCGCGGCCTCAAAAGGGGAGAG	GATAGTAGTGCGATGCTT	TAAAAG	AGGT						
SZMC 13042 Co.hawaiiensis	CCGCGGCCTCAGAAGGGGAGAG	AGTAGTAGTGCGATGCTT	GTAGTAGTAGGT				TGGAGTTG			
SZMC 13044 Co.australiensis										
SZMC 13056 Co.hawaiiensis	CCGCGGCCTCAGAAGGGGAGAG	AGTAGTAGTGCGATGCTT	GTAGTAGTAGGT				TGGAGTTG			
SZMC 13057 Co.spicifer	CCGCGGCCTCAGAAGGGGAGCG	TAGTAGTAGTGATGCTT			T		TGGAGATT			
SZMC 13012 B.sorokiniana										

	2310	2320	2330	2340	2350	2360	2370	2380	2390	2400
SZMC 13058	AAATTGCGT	TGAGACC		GTAATTATTGACACATGGTCT		AGCAGCCAGAA				
SZMC 13059										
SZMC 13060	T	TTTGACCAAGTC	TGACTGCAC	CAGCTAGTAAC	TTGTTATTGAGCACCAGCTAGTAAC	TTGTAAACCAGCTAGTAAC	TTGTG			
SZMC 13061	T	TTGGACCAAGTTG	TAGCAGCAGTAGCAGCTAGTAAC	TTGTGGGTTGGTAGCAGCTAGTAAC	TTG					
SZMC 13062	AAATTGCGT	TGAGACC		GTAATTATTGACACATGGTCT		AGCAGCCAGAA				
SZMC 13064	T	TTTGACCAAGTC	TGACTGCAC	CAGCTAGTAAC	TTGTTATTGAGCACCAGCTAGTAAC	TTGTAAACCAGCTAGTAAC	TTGTG			
SZMC 13065	T	TTGGACCAAGTTG	TAGCAGCAGTAGCAGCTAGTAAC	TTGTGGGTTGGTAGCAGCTAGTAAC	TTG					
SZMC 13066	AAATTGCGT	TGAGACC		GTAATTATTGACACATGGTCT		AGCAGCCAGAA				
SZMC 13067	T	TTGGACCAAGTTG	TAGCAGCAGTAGCAGCTAGTAAC	TTGTGGGTTGGTAGCAGCTAGTAAC	TTG					
SZMC 13068	T	TTTGACCAAGTC	TGACTGCAC	CAGCTAGTAAC	TTGTTATTGAGCACCAGCTAGTAAC	TTGTAAACCAGCTAGTAAC	TTGTG			
SZMC 13069	T	TTGGACCAAGTTG	TAGCAGCAGTAGCAGCTAGTAAC	TTGTGGGTTGGTAGCAGCTAGTAAC	TTG					
SZMC 21168	AAATTGCGT	TGAGACC		GTAATTATTGACACATGGTCT		AGCAGCCAGAA				
SZMC 13070	T	TTGGACCAAGTTG	TAGCAGCAGTAGCAGCTAGTAAC	TTGTGGGTTGGTAGCAGCTAGTAAC	TTG					
SZMC 13071	T	TTTGACCAAGTC	TGACTGCAC	CAGCTAGTAAC	TTGTTATTGAGCACCAGCTAGTAAC	TTGTAAACCAGCTAGTAAC	TTGTG			
SZMC 13073	T	TTTGACCAAGTC	TGACTGCAC	CAGCTAGTAAC	TTGTTATTGAGCACCAGCTAGTAAC	TTGTAAACCAGCTAGTAAC	TTGTG			
SZMC 13074	T	TTGGACCAAGTTG	TAGCAGCAGTAGCAGCTAGTAAC	TTGTGGGTTGGTAGCAGCTAGTAAC	TTG					
SZMC 13075	T	TTTGACCAAGTC	TGACTGCAC	CAGCTAGTAAC	TTGTTATTGAGCACCAGCTAGTAAC	TTGTAAACCAGCTAGTAAC	TTGTG			
SZMC 13063	T	TTGGACCAAGTTG	TAGCAGCAGTAGCAGCTAGTAAC	TTGTGGGTTGGTAGCAGCTAGTAAC	TTG					
SZMC 13078	T	TTTGACCAAGTC	TGACTGCAC	CAGCTAGTAAC	TTGTTATTGAGCACCAGCTAGTAAC	TTGTAAACCAGCTAGTAAC	TTGTG			
SZMC 13079	T	TTTGACCAAGTC	TGACTGCAC	CAGCTAGTAAC	TTGTTATTGAGCACCAGCTAGTAAC	TTGTAAACCAGCTAGTAAC	TTGTG			
SZMC 13080	AAATTGCGT	TGAGACC		GTAATTATTGACACATGGTCT		AGCAGCCAGAA				
SZMC 21169	AAATTGCGT	TGAGACC		GTAATTATTGACACATGGTCT		AGCAGCCAGAA				
SZMC 13081 B.spicifera	T	TTTGACCAAGTC	TGACTGCAC	CAGCTAGTAAC						
SZMC 13082 B.spicifera*	T	TTTGACCAAGTC	TGACTGCAC	CAGCTAGTAAC	TTGTTATTGAGCACCAGCTAGTAAC	TTGTAAACCAGCTAGTAAC	TTGTG			
SZMC 13083 B.hawaiiensis	T	TTGGACCAAGTTG	TAGCAGCAGTAGCAGCTAGTAAC	TTGTGGGTTGGTAGCAGCTAGTAAC	TTG					
SZMC 13084 B.hawaiiensis	T	TTGGACCAAGTTG	TAGCAGCAGTAGCAGCTAGTAAC	TTGTGGGTTGGTAGCAGCTAGTAAC	TTG					
SZMC 13085 B.hawaiiensis*	T	TTGGACCAAGTTG	TAGCAGCAGTAGCAGCTAGTAAC	TTGTGGGTTGGTAGCAGCTAGTAAC	TTG					
SZMC 13086 B.australiensis*	T	ATCG	TGCAGTAAC	TAATTTGTTGT	CACCAGCCAGTAAC	TTG				
SZMC 13087 B.australiensis	T	TTTGACCAAGTC	TGACTGCAC	CAGCTAGTAAC	TTGTTATTGAGCACCAGCTAGTAAC	TTGTAAACCAGCTAGTAAC	TTGTG			
SZMC 13088 B.spicifera	T	TTTGACCAAGTC	TGACTGCAC	CAGCTAGTAAC	TTGTTATTGAGCACCAGCTAGTAAC	TTGTAAACCAGCTAGTAAC	TTGTG			
SZMC 13041 Co.australiensis		ATCG	TGTAGTAAC	TTACTATTATAGTTTCTACA		TAGTAAC	TTGTTCTG	GC	AGTAAC	TTGT
SZMC 13042 Co.hawaiiensis	T	TTGGACCAAGTTG	TAGCAGCAGTAGCAGCTAGTAAC	TTGTGGGTTGGTAGCAGCTAGTAAC	TTG					
SZMC 13044 Co.australiensis										
SZMC 13056 Co.hawaiiensis	T	TTGGACCAAGTTG	TAGCAGCAGTAGCA							
SZMC 13057 Co.spicifer		TGGAGTTGGTTTGACCAAGTC	TAGCAGCAGTAGCAGCTAGTAAC	TTGTGCTTGAGCACCAGCTAGTAAC	TTG					
SZMC 13012 B.sorokiniana										

	2410	2420	2430	2440	2450	2460	2470	2480	2490	2500
SZMC 13058	TA	TCCAA	GT	CGGATATTTTCTACTAAATTACGTTGAGACCGTAATTATTCC			TAAACAGCCTGGCAGCTG		
SZMC 13059										
SZMC 13060	ATTT	TTTG	ACCAA	GTCCCA			C	AGCAGCAGCTAGTAACCTT		
SZMC 13061	TCGG									
SZMC 13062		TA	TCCAA	GT	CGGATATTTTCTACTAAATTACGTTGAGACCGTAATTATTCC			TAAACAGCCTGGCAGCTG		
SZMC 13064	ATTT	TTTG	ACCAA	GTCCCA			C	AGCAGCAGCTAGTAACCTT		
SZMC 13065	TTGGGTTTGGTTTTTG		GCCAA	GTCCAA			C	TACAGCAGCTAGTAACCTT		
SZMC 13066		TA	TCCAA	GT	CGGATATTTTCTACTAAATTACGTTGAGACCGTAATTATTCC			TAAACAGCCTGGCAGCTG		
SZMC 13067	TTGGGTTTGGTTTTTG		GCCAA	GTCCAA			C	TACAGCAGCTAGTAACCTT		
SZMC 13068	ATTT	TTTG	ACCAA	GTCCCA			C	AGCAGCAGCTAGTAACCTT		
SZMC 13069	TCGG									
SZMC 21168		TA	TCCAAAGTCGGATATTTTCTACTAAATTACGTTGAGACCGTAATTATTCC					TAAACCGCCTGGCAGCTG		
SZMC 13070	TTGGGTTTGGTTTTTG		GCCAA	GTCCAA			C	TACAGCAGCTAGTAACCTT		
SZMC 13071	ATTT	TTTG	ACCAA	GTCCCA			C	AGCAGCAGCTAGTAACCTT		
SZMC 13073	ATTT	TTTG	ACCAA	GTCCCA			C	AGCAGCAGCTAGTAACCTT		
SZMC 13074	TTGGGTTTGGTTTTTG		GCCAA	GTCCAA			C	TACAGCAGCTAGTAACCTT		
SZMC 13075	ATTT	TTTG	ACCAA	GTCCCA			C	AGCAGCAGCTAGTAACCTT		
SZMC 13063	TCGG									
SZMC 13078	ATTT	TTTG	ACCAA	GTCCCA			C	AGCAGCAGCTAGTAACCTT		
SZMC 13079	ATTT	TTTG	ACCAA	GTCCCA			C	AGCAGCAGCTAGTAACCTT		
SZMC 13080		TA	TCCAAAGTCGGATATTTTCTACTAAATTACGTTGAGACCGTAATTATTCC					TAAACCGCCTGGCAGCTG		
SZMC 21169		TA	TCCAAAGTCGGATATTTTCTACTAAATTACGTTGAGACCGTAATTATTCC					TAAACCGCCTGGCAGCTG		
SZMC 13081 B.spicifera										T
SZMC 13082 B.spicifera*	ATTT	TTTG	ACCAA	GTCCCA			C	AGCAGCAGCTAGTAACCTT		
SZMC 13083 B.hawaiiensis	TCGGATTGGTTTTTCG		ACCAA	GTCCAA				CAACTGCAGCAGCTAGTAACCTT		
SZMC 13084 B.hawaiiensis	TCGGGTTTGGTTTTTCG		ACCAA	GTCCAA						
SZMC 13085 B.hawaiiensis*	TCGGATTGGTTTTTCG		ACCAA	GTCCAA				CAACTGCAGCAGCTAGTAACCTT		
SZMC 13086 B.australiensis*	TT	TTTGCTGTTACCAA	GTCCGA				C	TGCTCCGTGCAGTAACCTCGAAAT		
SZMC 13087 B.australiensis	ATTT	TTTG	ACCAA	GTCCCA			C	AGCAGCAGCTAGTAACCTT		
SZMC 13088 B.spicifera	ATTT	TTTG	ACCAA	GTCCCA			C	AGCAGCAGCTAGTAACCTT		
SZMC 13041 Co.australiensis	TCGTGCAGTAACCTTGTTCTGCAGTAACCTTGTTCTGCAGTAGCTGATTTTTTGAAGTCTCCGTGCAGTAACCTTTTCTAGTAGCTGGTTTTTTG									
SZMC 13042 Co.hawaiiensis	TTGGGTTTGGTTTTTG		ACCAA	GTCCAA			C	TACAGCAGCTAGTAACCTT		
SZMC 13044 Co.australiensis										
SZMC 13056 Co.hawaiiensis										
SZMC 13057 Co.spicifer	TT	TTTG	A					GTAGCAGCTAGTAACCTT		
SZMC 13012 B.sorokiniana										

	2510	2520	2530	2540	2550	2560	2570	2580	2590	2600
SZMC 13058	GC	GTAT		CCAAGTCGAAAA	TATTATGAAATGCGCTG				
SZMC 13059										
SZMC 13060		GTCA	TTTTT		AGTCA		CCA	GCTAGTAACTTG		
SZMC 13061			TTT	TCGGTTTTCGACCAAGTC			CAA			
SZMC 13062		GC	GTAT		CCAAGTCGAAAA	TATTATGAAATGCGCTG				
SZMC 13064		GTCA	TTTTT		AGTCA		CCA	GCTAGTAACTTG		
SZMC 13065		GC	GGTTTTTTCGGTTC	TCGACCAAGTC			CCA			
SZMC 13066		GC	GTAT		CCAAGTCGAAAA	TATTATGAAATGCGCTG				
SZMC 13067		GC	GGTTTTTTCGGTTC	TCGACCAAGTC			CCA			
SZMC 13068		GTCA	TTTTT		AGTCA		CCA	GCTAGTAACTTG		
SZMC 13069			TTT	TCGGTTTTCGACCAAGTC			CAA			
SZMC 21168		GC	GTAT		CCAAGTCGAAAA	TATTATGGAATGCGCTG				
SZMC 13070		GC	GGTTTTTTCGGTTC	TCGACCAAGTC			CCA			
SZMC 13071		GTCA	TTTTT		AGTCA		CCA	GCTAGTAACTTG		
SZMC 13073		GTCA	TTTTT		AGTCA		CCA	GCTAGTAACTTG		
SZMC 13074		GC	GGTTTTTTCGGTTC	TCGACCAAGTC			CCA			
SZMC 13075		GTCA	TTTTT		AGTCA		CCA	GCTAGTAACTTG		
SZMC 13063			TTT	TCGGTTTTCGACCAAGTC			CAA			
SZMC 13078		GTCA	TTTTT		AGTCA		CCA	GCTAGTAACTTG		
SZMC 13079		GTCA	TTTTT		AGTCA		CCA	GCTAGTAACTTG		
SZMC 13080		GC	GTAT		CCAAGTCGAAAA	TATTATGGAATGCGCTG				
SZMC 21169		GC	GTAT		CCAAGTCGAAAA	TATTATGGAATGCGCTG				
SZMC 13081 B.spicifera		GTCA	TTTTT		AGTCA		CCA	GCTAGTAACTTG		
SZMC 13082 B.spicifera*		GTCA	TTTTT		AGTCA		CCA	GCTAGTAACTTG		
SZMC 13083 B.hawaiiensis		GC	GGTTT	TCGGTTTTCGACCAAGTC			CAA			
SZMC 13084 B.hawaiiensis							CAA			
SZMC 13085 B.hawaiiensis*		GC	GGTTT	TCGGTTTTCGACCAAGTC			CAACAA			
SZMC 13086 B.australiensis*	CTGCCTATTGCAGCCGCA	TTTGGCT	GTCT		AAGC		CA	ACTTGAAAAATAG		
SZMC 13087 B.australiensis		GTCA	TTTTT		AGTCA		CCA	GCTAGTAACTTG		
SZMC 13088 B.spicifera		GTCA	TTTTT		AGTCA		CCA	GCTAGTAACTTGTA		
SZMC 13041 Co.australiensis	TTACTAGCCAGTAAC	TTTTTTTTT	GTTGTTACCAAGTCCA	ACTGCTCCGTGCAGTAAC	TTAAACTTTTGACTATTG	CGGCCGACTCTGGCTG	TCGAATCCA			
SZMC 13042 Co.hawaiiensis		GC	GGTTTTTTCGGTTC	TCGACCAAGTC			CCA			
SZMC 13044 Co.australiensis										
SZMC 13056 Co.hawaiiensis										
SZMC 13057 Co.spicifer		GT	GCTT		GAGCA		CCA	GCTAGTAACTTG	TGCTTGAG	
SZMC 13012 B.sorokiniana										

	2610	2620	2630	2640	2650	2660	2670	2680	2690	2700
SZMC 13058	ATACCGTAACATAAAC									
SZMC 13059										
SZMC 13060	AC	CAGCTAGTAACCTTGTCAATTTTTTGACCAAGTCCCAC	TCGAGCAG	CTAGTAACCTTGTGATT						
SZMC 13061	CTGCAGCAGCTAGTAACCTTG									
SZMC 13062	ATACCGTAACATAAAC									
SZMC 13064	AC	CAGCTAGTAACCTTGTCAATTTTTTGACCAAGTCCCAC	TCGAGCAG	CTAGTAACCTTGTGATT						
SZMC 13065	CTGC									
SZMC 13066	ATACCGTAACATAAAC									
SZMC 13067	CTGC									
SZMC 13068	AC	CAGCTAGTAACCTTGTCAATTTTTTGACCAAGTCCCAC	TCGAGCAG	CTAGTAACCTTGTGATT						
SZMC 13069	CTGCAGCAGCTAGTAACCTTG									
SZMC 21168	ATACCGTAATATAAAC									
SZMC 13070	CTGC									
SZMC 13071	AC	CAGCTAGTAACCTTGTCAATTTTTTGACCAAGTCCCAC	TCGAGCAG	CTAGTAACCTTGTGATT						
SZMC 13073	AC	CAGCTAGTAACCTTGTCAATTTTTTGACCAAGTCCCAC	TCGAGCAG	CTAGTAACCTTGTGATT						
SZMC 13074	CTGC									
SZMC 13075	AC	CAGCTAGTAACCTTGTCAATTTTTTGACCAAGTCCCAC	TCGAGCAG	CTAGTAACCTTGTGATT						
SZMC 13063	CTGCAGCAGCTAGTAACCTTG									
SZMC 13078	AC	CAGCTAGTAACCTTGTCAATTTTTTGACCAAGTCCCAC	TCGAGCAG	CTAGTAACCTTGTGATT						
SZMC 13079	AC	CAGCTAGTAACCTTGTCAATTTTTTGACCAAGTCCCAC	TCGAGCAG	CTAGTAACCTTGTGATT						
SZMC 13080	ATACCGTAATATAAAC									
SZMC 21169	ATACCGTAATATAAAC									
SZMC 13081 B.spicifera	AC	CAGCTAGTAACCTTGTCAATTTTTTGACCAAGTCCCAC	TCGAGCAG	CTAGTAACCTTGTGATT						
SZMC 13082 B.spicifera*	AC	CAGCTAGTAACCTTGTCAATTTTTTGACCAAGTCCCAC	TCGAGCAG	CTAGTAACCTTGTGATT						
SZMC 13083 B.hawaiiensis	CTGCAGCAGCTAGTAACCTTG GCGGT TT									
SZMC 13084 B.hawaiiensis	CTGCAGCAGCTAGTAACCTTG GCGGT TT									
SZMC 13085 B.hawaiiensis*	CTGCAGCAGCTAGTAACCTTG GCGGT TT									
SZMC 13086 B.australiensis*	CCAAAAGTAGCTAATAA	GA	GTAGGAAATCTATCCCCAGCGATAGAACGCTTAGATCTAGTAGTTGATAATT							
SZMC 13087 B.australiensis	AC	CAGCTAGTAACCTTGTCAATTTTTTGACCAAGTCCCAC	TCGAGCAG	CTAGTAACCTTGTGATT						
SZMC 13088 B.spicifera	AC	CAGCTAGTAACCTTGT GATTTTTTGACCAAGTCCCACAGCAGCAG	CTAGTAACCTTGTGATT							
SZMC 13041 Co.australiensis	CCTTGAAAAATAGCCAAAAGTAGGCCATAATACTAAGGAATCGATTGTATATTAATAGTAGTGTCTAGATTAGGTAGTTGATAATTTTGGCAAAAGTTG									
SZMC 13042 Co.hawaiiensis	CTGCAGCAGCTAGTAACCTTG TGGGTTG GTAGCAG CTAGTAACCTTGTGGGT									
SZMC 13044 Co.australiensis										
SZMC 13056 Co.hawaiiensis	G CTAGTAACCTTGTGGGT									
SZMC 13057 Co.spicifer	CAC	CAGCTAGTAACCTTG	TTTTTGA	GTAGCAG	CTAGTAACCTTGTG					
SZMC 13012 B.sorokiniana										

	2710	2720	2730	2740	2750	2760	2770	2780	2790	2800
SZMC 13058	AGATAGCCT								
SZMC 13059					AGCAGCCAAAGTATCCAAGTCTGAAATGTAAGAAAATGCGCTAATACCGT					
SZMC 13060	TT	TTGT	TTG		ACCAGCTA					GT
SZMC 13061										
SZMC 13062		AGATAGCCT			AGCAGCCAAAGTATCCAAGTCTGAAATGTAAGAAAATGCGCTAATACCGT					
SZMC 13064	TT	TTGT	TTG		ACCAGCTA					GT
SZMC 13065					AGCAGCTA					GT
SZMC 13066		AGATAGCCT			AGCAGCCAAAGTATCCAAGTCTGAAATGTAAGAAAATGCGCTAATACCGT					
SZMC 13067					AGCAGCTA					GT
SZMC 13068	TT	TTGT	TTG		ACCAGCTA					GT
SZMC 13069										
SZMC 21168		GGATAGCCT			AGCAGCCAAAGTATCCAAGTCTGAAATGTAAGAAAATGCGCTGATACCGT					
SZMC 13070					AGCAGCTA					GT
SZMC 13071	TT	TTGT	TTG		ACCAGCTA					GT
SZMC 13073	TT	TTGT	TTG		ACCAGCTA					GT
SZMC 13074					AGCAGCTA					GT
SZMC 13075	TT	TTGT	TTG		ACCAGCTA					GT
SZMC 13063										
SZMC 13078	TT	TTGT	TTG		ACCAGCTA					GT
SZMC 13079	TT	TTGT	TTG		ACCAGCTA					GT
SZMC 13080		GGATAGTCT			AGCAGCCAAAGTATCCAAGTCTGAAATGTAAGAAAATGCGCTGATACCGT					
SZMC 21169		GGATAGTCT			AGCAGCCAAAGTATCCAAGTCTGAAATGTAAGAAAATGCGCTGATACCGT					
SZMC 13081 B.spicifera	TT	TTGT	TTG		ACCAGCTA					GT
SZMC 13082 B.spicifera*	TT	TAGT	C		ACCAGCTA					GT
SZMC 13083 B.hawaiiensis	TT	TTGG	T	TTCCAACCAAGTCTAATTCTAGCAGCTA						GT
SZMC 13084 B.hawaiiensis	TT	TTGG	T	TTCCAACCAAGTCTAATTCTAGCAGCTA						GT
SZMC 13085 B.hawaiiensis*	TT	TTGG	T	TTCCAACCAAGTCTAATTCTAGCAGCTA						GT
SZMC 13086 B.australiensis*	TTGGCAAAGTTGATTTTGT		C		AGCATGTA					GT
SZMC 13087 B.australiensis	TT	TAGT	C		ACCAGCTA					GT
SZMC 13088 B.spicifera	TT	TTGT	TTG		ACCAGCTA					AT
SZMC 13041 Co.australiensis				ATTTTGGCACCAGCTAGTAATAAAAAATTTTGCACCACCAAGTCCAACTGCAGCAGCAGCTAGT						
SZMC 13042 Co.hawaiiensis	T	GG	T		AGCAGCTA					GT
SZMC 13044 Co.australiensis										
SZMC 13056 Co.hawaiiensis	T	GG	T		AGCAGCTA					GT
SZMC 13057 Co.spicifer										
SZMC 13012 B.sorokiniana										

	2810	2820	2830	2840	2850	2860	2870	2880	2890	2900
SZMC 13058	AA	GTTTGGTTCAG	CGGCCAAAATCTCCATCTCTC	ATATATTGTAAATAC					GTCGATACCGTAAGTT	
SZMC 13059										
SZMC 13060	AAC	TTATTGTTT			G	CCAGCTAGTAACCTTGTGGCTTATTATTTCAAGT			TTT	
SZMC 13061		TTGGGTTTGGTTTTCGACCAAG	TCCGACTTCA		GCAGCTAGTAACCTTGC		G		ATTTT	
SZMC 13062	AA	GTTTGGTTCAG	CGGCCAAAATCTCCATCTCTC	ATATATTGTAAATAC					GTCGATACCGTAAGTT	
SZMC 13064	AAC	TTATTGTTT			G	CCAGCTAGTAACCTTGTGGCTTATTATTTCAAGT			TTT	
SZMC 13065	AAC	TTGTTAGGTTTGGTTTTCACCAAG	TCCAACCTCTA		GCAGCTAGTAACCTTGC		G		ACTTT	
SZMC 13066	AA	GTTTGGTTCAG	CGGCCAAAATCTCCATCTCTC	ATATATTGTAAATAC					GTCGATACCGTAAGTT	
SZMC 13067	AAC	TTGTTAGGTTTGGTTTTCACCAAG	TCCAACCTCTA		GCAGCTAGTAACCTTGC		G		ACTTT	
SZMC 13068	AAC	TTATTGTTT			G	CCAGCTAGTAACCTTGTGGCTTATTATTTCAAGT			TTT	
SZMC 13069		TTGGGTTTGGTTTTCGACCAAG	TCCGACTTCA		GCAGCTAGTAACCTTGC		G		ATTTT	
SZMC 21168	AA	GTTTGGTTCAG	CGGCTAAAATCTCCATCTCTC	ATTTATTGTAAATAC					GTCGATACCGTAAGTT	
SZMC 13070	AAC	TTGTTAGGTTTGGTTTTCACCAAG	TCCAACCTCTA		GCAGCTAGTAACCTTGC		G		ACTTT	
SZMC 13071	AAC	TTATTGTTT			G	CCAGCTAGTAACCTTGTGGCTTATTATTTCAAGT			TTT	
SZMC 13073	AAC	TTATTGTTT			G	CCAGCTAGTAACCTTGTGGCTTATTATTTCAAGT			TTT	
SZMC 13074	AAC	TTGTTAGGTTTGGTTTTCACCAAG	TCCAACCTCTA		GCAGCTAGTAACCTTGC		G		ACTTT	
SZMC 13075	AAC	TTATTGTTT			G	CCAGCTAGTAACCTTGTGGCTTATTATTTCAAGT			TTT	
SZMC 13063		TTGGGTTTGGTTTTCGACCAAG	TCCGACTTCA		GCAGCTAGTAACCTTGC		G		ATTTT	
SZMC 13078	AAC	TTATTGTTT			G	CCAGCTAGTAACCTTGTGGCTTATTATTTCAAGT			TTT	
SZMC 13079	AAC	TTATTGTTT			G	CCAGCTAGTAACCTTGTGGCTTATTATTTCAAGT			TTT	
SZMC 13080	AA	GTTTGGTTCAG	CGGCTAAAATCTCCATCTCTC	ATTTATTGTAAATAC					GTCGATACCGTAAGTT	
SZMC 21169	AA	GTTTGGTTCAG	CGGCTAAAATCTCCATCTCTC	ATTTATTGTAAATAC					GTCGATACCGTAAGTT	
SZMC 13081 B.spicifera	AAC	TTATTGTTT			G	CCAGCTAGTAACCTTGTGGCTTATTATTTCAAGT			TTT	
SZMC 13082 B.spicifera*	AAC	TTG			A	CCAGCTAGTAACCTTGT		CAATT	TTT	
SZMC 13083 B.hawaiiensis	AAC	TTGTTGGGTTTGGTTTTCGACCAAG	TCCGACTTCA		GCAGCTAGTAACCTTGC		G		ATTTT	
SZMC 13084 B.hawaiiensis	AAC	TTGTTGGGTTTGGTTTTCGACCAAG	TCCGACTTCA		GCAGCTAGTAACCTTGC		G		ATTTT	
SZMC 13085 B.hawaiiensis*	AAC	TTGTTGGGTTTGGTTTTCGACCAAG	TCCGACTTCA		GCAGCTAGTAACCTTGC		G		ATTTT	
SZMC 13086 B.australiensis*	AAC	TT				ATTTCT			GTT	
SZMC 13087 B.australiensis	AAC	TTG			A	CCAGCTAGTAACCTTGT		CAATT	TTT	
SZMC 13088 B.spicifera	AAC	TTATTGTTT			G	CCAGCTAGTGACTTGTGGCTTATTATTTCAAGT			TTT	
SZMC 13041 Co.australiensis	AAC	TTGAAAGTTTGGCTCTAGTAGCCGACTCTGGCTGTCGAATCCACCCCGAAAATAGCCAAAAC	TAGGCCATTAATAC	TCGGAAATCAATCAGA						
SZMC 13042 Co.hawaiiensis	AAC	TTGTTGGGTTTGGTTTTCGACCAAG	TCCAACCTCTA		GCAGCTAGTAACCTTGC		G		ACTTT	
SZMC 13044 Co.australiensis										
SZMC 13056 Co.hawaiiensis	AAC	TTGTTGGGTTTGGTTTTCGACCAAG	TCCAACCTCTA		GCAGCTAGTAACCTTGC		G		ACTTT	
SZMC 13057 Co.spicifer	C	TTG			AGCACCAGCTAGTAACCTTGT				TTT	
SZMC 13012 B.sorokiniana										

	2910	2920	2930	2940	2950	2960	2970	2980	2990	3000
SZMC 13058	TG	GCTCAGCAGCCAAAATCTCCATCT			CTCATATA	TTGT		T		
SZMC 13059										
SZMC 13060	TGTTTTCTCA	ACCCAG	TCCAAC	TACCATCTAGT	AACTTATAGAC	TGTT		A		
SZMC 13061	TG	TATCTTCAACC								
SZMC 13062	TG	GCTCAGCAGCCAAAATCTCCATCT			CTCATATA	TTGT		T		
SZMC 13064	TGTTTTCTCA	ACCCAG	TCCAAC	TACCATCTAGT	AACTTATAGAC	TGTT		A		
SZMC 13065	TG	TATCCTCAACCAAG	TCCAAC	TGACCATCTAGT	TAACTTAGAAC	TTTT		TTTTTCTTTTCTCTTTTCTTCCTT		
SZMC 13066	TG	GCTCAGCAGCCAAAATCTCCATCT			CTCATATA	TTGT		T		
SZMC 13067	TG	TATCCTCAGCCAAG	TCCAAC	TGACCATCTAGT	TAACTTGGAAC	TTTTT		TTTTTCTTTTCTCTTTTCTTCCTT		
SZMC 13068	TGTTTTCTCA	ACCCAG	TCCAAC	TACCATCTAGT	AACTTATAGAC	TGTT		A		
SZMC 13069	TG	TATCTTCAACCAAG	TCCAAC	TGACCATCTAGT	TAACTTGGAAC	TTTTGTTT	TTTCC			
SZMC 21168	TG	GCTCAGCAGCCAAAATCTCCATCT			CTCATTTA	TTGT		T		
SZMC 13070	TG	TATCCTCAACCAAG	TCCAAC	TGACCATCTAGT	TAACTTAGAAC	TTTT		TTTTTCTTTTCTCTTTTCTTCCTT		
SZMC 13071	TGTTTTCTCA	ACCCAG	TCCAAC	TACCATCTAGT	AACTTATAGAC	TGTT		A		
SZMC 13073	TGTTTTCTCA	ACCCAG	TCCAAC	TACCATCTAGT	AACTTATAGAC	TGTT		A		
SZMC 13074	TG	TATCCTCAGCCAAG	TCCAAC	TGACCATCTAGT	TAACTTGGAAC	TTTTT		TTTTTCTTTTCTCTTTTCTTCCTT		
SZMC 13075	TGTTTTCTCA	ACCCAG	TCCAAC	TACCATCTAGT	AACTTATAGAC	TGTT		A		
SZMC 13063	TG	TATCTTCAACCAAG	TCCAAC	TGACCATCTAGT	TAACTTGGAAC	TTTTGTTT	TTTCC			
SZMC 13078	TGTTTTCTCA	ACCCAG	TCCAAC	TACCATCTAGT	AACTTATAGAC	TGTT		A		
SZMC 13079	TGTTTTCTCA	ACCCAG	TCCAAC	TACCATCTAGT	AACTTATAGAC	TGTT		A		
SZMC 13080	TG	GCTCAGCAGCCAAAATCTCCATCT			CTCATTTA	TTGT		T		
SZMC 21169	TG	GCTCAGCAGCCAAAATCTCCATCT			CTCATTTA	TTGT		T		
SZMC 13081 B.spicifera	TGTTTTCTCA	ACCCAG	TCCAAC	TACCATCTAGT	AACTTATAGAC	TGTT		A		
SZMC 13082 B.spicifera*	TG	ACCAAG	TCCCACT							
SZMC 13083 B.hawaiiensis	TG	TATCTTCAACCAAG	TCCAAC	TGACCATCTAGT	TAACTTGCGAT	TTTTGTTT	TTTCC			
SZMC 13084 B.hawaiiensis	TG	TATCTTCAACCAAG	TCCAAC	TGACCATCTAGT	TAACTTGGAAC	TTTTGTTTTTTTCC				
SZMC 13085 B.hawaiiensis*	TG	TATCTTCAACCAAG	TCCAAC	TGACCATCTAGT	TAACTTGGAAC	TTTTGTTT	TTTCC			
SZMC 13086 B.australiensis*		G	TCCAAC	TGCTCCGTGCAGT	AACTTCGAAA	TCTG		C		
SZMC 13087 B.australiensis	TG	ACCAAG	TCCCACT							
SZMC 13088 B.spicifera	TGTTTTCTCA	ACGCAA	TCCAAC	TACCATCTAGT	AACTTATAGAC	TGTT		A		
SZMC 13041 Co.australiensis										
SZMC 13042 Co.hawaiiensis	TG	TATCCTCAACCAAG	TCCAAC	TGACCATCTAGT	TAACTTAGAAC	TTTT		TTTTTCTTTTCTCTTTTCTTCCTT		
SZMC 13044 Co.australiensis										
SZMC 13056 Co.hawaiiensis	TG	TATCCTCAACCAAG	TCCAAC	TGACCATCTAGT	TAACTTAGAAC	TTTT		TTTTTCTTTTCTCTTTTCTTCCTT		
SZMC 13057 Co.spicifer	TG	A								
SZMC 13012 B.sorokiniana										

	3010	3020	3030	3040	3050	3060	3070	3080	3090	3100
SZMC 13058	AAATACGTCGATACCGTAAGTTTGGCTCAGCAGCCAAAAT				CTCCATCT			CTCATATATTGTTAAATA		CGTCG
SZMC 13059										
SZMC 13060	ATATA			ATAGCTAATTTTAGCTATTAATCCAAC	TCCAAGA				CTACTAAGAGCAG	
SZMC 13061										
SZMC 13062	AAATACGTCGATACCGTAAGTTTGGCTCAGCAGCCAAAAT				CTCCATCT			CTCATATATTGTTAAATA		CGTCG
SZMC 13064	ATATA			ATAGCTAATTTTAGCTATTAATCCAAC	TCCAAGA				CTACTAAGAGCAG	
SZMC 13065	TTCTATATT			ATAGCCAACCTTAGCTACTATATCTAATATAGAAGTAGCCTTACGT				AGCTA		AGTAG
SZMC 13066	AAATACGTCGATACCGTAAGTTTGGCTCAGCAGCCAAAAT				CTCCATCT			CTCATATATTGTTAAATA		CGTCG
SZMC 13067										
SZMC 13068	ATATA			ATAGCTAATTTTAGCTATTAATCCAAC	TCCAAGA				CTACTAAGAGCAG	
SZMC 13069	AAATT			ATAGCCAACCTTGGCTACTACATCTAATGTAGAAGTAGCCTCAAGT				AGCTA		AGTAG
SZMC 21168	AAATACGTCGATACCGTAAGTTTGGCTCAGCAGCCAAAAT				CTCCATCT			CTCAAGTATTATGAAATG		CGTTG
SZMC 13070	TTCTATATT			ATAGCCAACCTTAGCTACTATATCTAATATAGAAGTAGCCTTACGT				AGCTA		AGTAG
SZMC 13071	ATATA			ATAGCTAATTTTAGCTATTAATCCAAC	TCCAAGA				CTACTAAGAGCAG	
SZMC 13073	ATATA			ATAGCTAATTTTAGCTATTAATCCAAC	TCCAAGA				CTACTAAGAGCAG	
SZMC 13074	TTCTATATT			ATAGCCAACCTTAG						
SZMC 13075	ATATA			ATAGCTAATTTTAGCTATTAATCCAAC	TCCAAGA				CTACTAAGAGCAG	
SZMC 13063	AAATT			ATAGCCAACCTTGGCTACTACATCTAATGTAGAAGTAGCCTCAAGT				AGCTA		AGTAG
SZMC 13078	ATATA			ATAGCTAATTTTAGCTATTAATCCAAC	TCCAAGA				CTACTAAGAGCAG	
SZMC 13079	ATATA			ATAGCTAATTTTAGCTATTAATCCAAC	TCCAAGA				CTACTAAGAGCAG	
SZMC 13080	AAATACGTCGATACCGTAAGTTTGGCTCAGCAGCCAAAAT				CTCCAAGT			CTCAAGTATTATGAAATG		CGTTG
SZMC 21169	AAATACGTCGATACCGTAAGTTTGGCTCAGCAGCCAAAAT				CTCCAAGT			CTCAAGTATTATGAAATG		CGTTG
SZMC 13081 B.spicifera	ATATA			ATAGCTAATTTTAGCTATTAATCCAAC	TCCAAGA				CTACTAAGAGCAG	
SZMC 13082 B.spicifera*										GCAG
SZMC 13083 B.hawaiiensis	AAATT			ATAGCCAACCTTGGCTACTACATCTAATGTAGAAGTAGCCTCAAGT				AGCTG		AGTAG
SZMC 13084 B.hawaiiensis	AAATT			ATAGCCAACCTTGGCTACTACATCTAATGTAGAAGTAGCCTCAAGT				AGCTG		AGTAG
SZMC 13085 B.hawaiiensis*	AAATT			ATAGCCAACCTTGGCTACTACATCTAATGTAGAAGTAGCCTCAAGT				AGCTG		AGTAG
SZMC 13086 B.australiensis*	CTATT			GCAGCCGCAATTTGGCTGCTAAGCCAACTTGAAATAGCCAAAAGT				AGCTAATAAGAGTAG		GCAG
SZMC 13087 B.australiensis										
SZMC 13088 B.spicifera	ATATA			ATAGCTAATTTTAGCTATTAATCCAAC	TCCAAGA				CTA	
SZMC 13041 Co.australiensis										
SZMC 13042 Co.hawaiiensis	TTCTAAATT			ATAGCTAACCTTAGCTACTATATCTGATATAGAAGTAGCCTTACGT				AGCTA		AGTAG
SZMC 13044 Co.australiensis										
SZMC 13056 Co.hawaiiensis	TTCTAAATT			ATAGCTAACCTTAGCTACTATATCTAATATAGAAGTAGCCTTACGT				AGCTA		AGTAG
SZMC 13057 Co.spicifer										GTAG
SZMC 13012 B.sorokiniana										

		3110	3120	3130	3140	3150	3160	3170	3180	3190	3200
	
SZMC 13058		-----									
SZMC 13059		-----									
SZMC 13060		CTAATAAGACGACTAAGCTAATTAATATATTAACAGTAGCGCGTAGAATAGATTATAAGAAGATTTTAGCATACGTCGAGTTTTTATAGTAGCTAGTACC									
SZMC 13061		-----									
SZMC 13062		-----									
SZMC 13064		CTAATAAGACGACTAAGCTAATTAATATATTAACAGTAGCGCGTAGAATAGATTATAAGAAGATTTTAGCATACGTCGAGTTTTTATAGTAGCTAGTACC									
SZMC 13065		-----									
SZMC 13066		-----									
SZMC 13067		-----									
SZMC 13068		CTAATAAGACGACTAAGCTAATTAATATATTAACAGTAGCGCGTAGAATAGATTATAAGAAGATTTTAGCATACGTCGAGTTTTTATAGTAGCTAGTACC									
SZMC 13069		-----									
SZMC 21168		-----									
SZMC 13070		-----									
SZMC 13071		CTAATAAGACGACTAAGCTAATTAATATATTAACAGTAGCGCGTAGAATAGATTATAAGAAGATTTTAGCATACGTCGAGTTTTTATAGTAGCTAGTACC									
SZMC 13073		CTAATAAGACGACTAAGCTAATTAATATATTAACAGTAGCGCGTAGAATAGATTATAAGAAGATTTTAGCATACGTCGAGTTTTTATAGTAGCTAGTACC									
SZMC 13074		-----									
SZMC 13075		CTAATAAGACGACTAAGCTAATTAATATATTAACAGTAGCGCGTAGAATAGATTATAAGAAGATTTTAGCATACGTCGAGTTTTTATAGTAGCTAGTACC									
SZMC 13063		-----									
SZMC 13078		CTAATAAGACGACTAAGCTAATTAATATATTAACAGTAGCGCGTAGAATAGATTATAAGAAGATTTTAGCATACGTCGAGTTTTTATAGTAGCTAGTACC									
SZMC 13079		CTAATAAGACGACTAAGCTAATTAATATATTAACAGTAGCGCGTAGAATAGATTATAAGAAGATTTTAGCATACGTCGAGTTTTTATAGTAGCTAGTACC									
SZMC 13080		-----									
SZMC 21169		-----									
SZMC 13081	B.spicifera	CTAATAAGACGACTAAGCTAATTAATATATTAACAGTAGCGCGTAGAATAGATTATAAGAAGATTTTAGCATACGTCGAGTTTTTATAGTAGCTAGTACC									
SZMC 13082	B.spicifera*	C-----									AGCTAGTAAC
SZMC 13083	B.hawaiiensis	-----									
SZMC 13084	B.hawaiiensis	-----									
SZMC 13085	B.hawaiiensis*	-----									
SZMC 13086	B.australiensis*	-----									
SZMC 13087	B.australiensis	C-----									AGCTAGTAAC
SZMC 13088	B.spicifera	-----									
SZMC 13041	Co.australiensis	-----									
SZMC 13042	Co.hawaiiensis	-----									
SZMC 13044	Co.australiensis	-----									
SZMC 13056	Co.hawaiiensis	-----									
SZMC 13057	Co.spicifer	C-----									AGCTAGTAAC
SZMC 13012	B.sorokiniana	-----									

	3210	3220	3230	3240	3250	3260	3270	3280	3290	3300
SZMC 13058	ATACCGT	AAG								
SZMC 13059										
SZMC 13060	T-TGT									
SZMC 13061										
SZMC 13062	ATACCGT	AAG								
SZMC 13064	T-TGT									
SZMC 13065	ATAGAGTAGAGAAAT	GAAT								TA
SZMC 13066	ATACCGT	AAG								
SZMC 13067										
SZMC 13068	T-TGT									
SZMC 13069	ATAGAGCAGAGAAC-AAATTATAGTATATTTCATAGTAGAACTCGGGCTATATATATATAAATTAAAAGTTTGTAGCCAAGACTTAAACTCTAGTA									
SZMC 21168	ATACCGT	AAT								
SZMC 13070	ATAGAGTAGAGAAAT	GAAT								TA
SZMC 13071	T-TGT									
SZMC 13073	TTTGT									
SZMC 13074										
SZMC 13075	T-TGT									
SZMC 13063	ATAGAGCAGAGAAC-AAATTATAGTATATTTCATAGTAGAACTCGGGCTATATATATATAAATTAAAAGTTTGTAGCCAAGACTTAAACTCTAGTA									
SZMC 13078	T-TGT									
SZMC 13079	T-TGT									
SZMC 13080	ATACCGT	AAT								
SZMC 21169	ATACCGT	AAT								
SZMC 13081 B.spicifera	T-TGT									
SZMC 13082 B.spicifera*	T-TGT									
SZMC 13083 B.hawaiiensis	ATAGAGCAGAGAAC-AAAT									
SZMC 13084 B.hawaiiensis	ATAGAGCAGAGAACAAAAAT									
SZMC 13085 B.hawaiiensis*	ATAGAGCAGAGAAC-AAAT									
SZMC 13086 B.australiensis*										
SZMC 13087 B.australiensis	T-TGT									
SZMC 13088 B.spicifera										
SZMC 13041 Co.australiensis										
SZMC 13042 Co.hawaiiensis	ATAGAGTAGAGAAAT-AAAT									TA
SZMC 13044 Co.australiensis										
SZMC 13056 Co.hawaiiensis	ATAGAGTAGAGAAAT-AAAT									TA
SZMC 13057 Co.spicifer	T-TGT									
SZMC 13012 B.sorokiniana										

	3310	3320	3330	3340	3350	3360	3370	3380	3390	3400
SZMC 13058	TTTGGCTCAGCAGCCAAAATCTCCATCTCTCATATAT							TGTTA		
SZMC 13059										
SZMC 13060						GATTTT	TTTTCACCAGCTAGGAACTTG		TCCAGCTAGTA	
SZMC 13061										
SZMC 13062	TTTGGCTCAGCAGCCAAAATCTCCATCTCTCATATAT							TGTTA		
SZMC 13064						GATTTT	TTTTCACCA			
SZMC 13065	TAA		TAATATATACAGCCCAAGCTATACTATTAATATA			TAGTTAGTGGTTA				TAGTA
SZMC 13066	TTTGGCTCAGCAGCCAAAATCTCCATCTCTCATATAT							TGTTA		
SZMC 13067										
SZMC 13068						GATTTT	TTTTCACCAGCTAGGAACTTG		TC	
SZMC 13069	AA		TAGTAGAT				AGTTA			TAGTA
SZMC 21168	TT		TCATGTAT				AGCCA			
SZMC 13070	TAA		TAATATATACAGCCCAAGCTATACTATTAATATA			TAGTTAGTGGTTA				TAGTA
SZMC 13071						GATTTT	TTTTCACCAGCTAGGAACTTG		TCCAGCTAGTA	
SZMC 13073						GATTTTTTTTTT	CACCA			
SZMC 13074										
SZMC 13075						GATTTT	TTTTCACCAGCTAGGAACTTG		TCCAGCTAGTA	
SZMC 13063	AA		TAGTAGAT				AGTTA			TAGTA
SZMC 13078						GATTTT	TTTTCACCA			
SZMC 13079						GATTTT	TTTTCACCA			
SZMC 13080	TT		TCATGTAT				AGCCA			
SZMC 21169	TT		TCATGTAT				AGCCA			
SZMC 13081 B.spicifera						GATTTT	TTTTCACCA			
SZMC 13082 B.spicifera*						CATTTT	TAGTCACCAGCTAGTAACCTTG		ACCAGCTAGTA	
SZMC 13083 B.hawaiiensis	AA		TAGTAGAT				AGTTA			TAGTA
SZMC 13084 B.hawaiiensis	AA		TAGTAGAT				AGTTA			TAGTA
SZMC 13085 B.hawaiiensis*	AA		TAGTAGAT				AGTTA			TAGTA
SZMC 13086 B.australiensis*						GAAATC	TATCCCCCAGCGA			TAGAA
SZMC 13087 B.australiensis						GATTTT	TTGTTG		ACCAGCTAGTA	
SZMC 13088 B.spicifera										
SZMC 13041 Co.australiensis										
SZMC 13042 Co.hawaiiensis	TAA		TAATATATATAGCCCAAGCTATACTATTAATATA			TAGTTAGTAGTTA				TAGTA
SZMC 13044 Co.australiensis										
SZMC 13056 Co.hawaiiensis	TAA		TAATATATATAGCCCAAGCTATACTATTAATATA			TAGTTAGTAGTTA				TAGTA
SZMC 13057 Co.spicifer						G			CTTGAGCACCCAGCTAGTA	
SZMC 13012 B.sorokiniana										

	3410	3420	3430	3440	3450	3460	3470	3480	3490	3500
SZMC 13058
SZMC 13059
SZMC 13060	ACTTGT	C			CAGCTAGTAAC TTG			TC		
SZMC 13061
SZMC 13062
SZMC 13064
SZMC 13065	G				TAGTAGCTAGAGATTTAGAACTCTTATTCT	T				TTA
SZMC 13066
SZMC 13067
SZMC 13068
SZMC 13069	G				TAGTAGCTAGAGATTTAGAGTCTTATTCT	T				TTA
SZMC 21168
SZMC 13070	G				TAGTAGCTAGAGATTTAGAACTCTTATTCT	T				TTA
SZMC 13071	ACTTGT	C			CAGCTAGTAAC TTG			TC		
SZMC 13073
SZMC 13074
SZMC 13075	ACTTGT	C			CAGCTAGTAAC T					
SZMC 13063	G				TAGTAGCTAGAGATTTAGAGTCTTATTCT	T				TTA
SZMC 13078
SZMC 13079
SZMC 13080
SZMC 21169
SZMC 13081 B.spicifera
SZMC 13082 B.spicifera*	ACTTGT	CAATTTTTTGACCAAGTCCCAC	TGCAGCAGCTAGTAAC TTG					TCAT		TTT
SZMC 13083 B.hawaiiensis	G				TAGTAGCTAGAGATTTAGAGCCTTATTCT	T				TTA
SZMC 13084 B.hawaiiensis	G				TAGTAGCTAGAGATTTAGAGTCTTATTCT	T				TTA
SZMC 13085 B.hawaiiensis*	G				TAGTAGCTAGAGATTTAGAGTCTTATTCT	T				TTA
SZMC 13086 B.australiensis*	GCGCTT	A			GATCTAGTAGTTTG		A	TAATTTTTGGCAAAGTTGATTT		
SZMC 13087 B.australiensis	ACTTATTGTTTGGC				CAGCTAGTAAC TTG		TGG CT			
SZMC 13088 B.spicifera
SZMC 13041 Co.australiensis
SZMC 13042 Co.hawaiiensis	G				TAGTAGCTAGAGATTTAGAACCTTATTCT	T				TTA
SZMC 13044 Co.australiensis
SZMC 13056 Co.hawaiiensis	G				TAGTAGCTAGAGATTTAGAACCTTATTCT	T				TTA
SZMC 13057 Co.spicifer	ACTTGTGCTTGAGCAC				CAGCTAGTAAC TTG		T T			TTT
SZMC 13012 B.sorokiniana

[illegible]

[illegible][illegible]

	4110	4120	4130	4140	4150	4160	4170	4180	4190	4200
									
SZMC 13058	CAAGGGGCGACCTGGCGCAGTTAAGCGGCGCAGTAT	-AGCCCAGCAGCTTGATAGACCCCGCCAAAATCGCCACCTG	CAGCGCAATAGCCCGCCAGTTGG							
SZMC 13059	CAAGGGGCGACCTGGCGCAATTAAGCAGCGCAGTAT	-AGCCCAGCAGCACAAAGATCCCCACCAAATGCCCCGCTCGCAGAGCAGTAAGCCGCGCTTTGG								
SZMC 13060	CAAGGGGCGACCTGGCGCAATTAAGCAGCGCAGTAT	-AGCCCAGCAGCCCAGTAGACCCCGCCGAAATCGCCACCTACAGCGCAATAGTCCGCCAGTTGG								
SZMC 13061	CAAGGGGCGACCTGGCGCGTTAAGCAGCGCAGTAT	-AGCCCAGCAGCCCAGTAGACCCCGCCAAAATCGCTACTTGCAGCGCAATAGTCCGCCAGTTGG								
SZMC 13062	CAAGGGGCGACCTGGCGCAGTTAAGCGGCGCAGTAT	-AGCCCAGCAGCTTGATAGACCCCGCCAAAATCGCCACCTG	CAGCGCAATAGCCCGCCAGTTGG							
SZMC 13064	CAAGGGGCGACCTGGCGCAATTAAGCAGCGCAGTAT	-AGCCCAGCAGCCCAGTAGACCCCGCCGAAATCGCCACCTACAGCGCAATAGTCCGCCAGTTGG								
SZMC 13065	CAAGGGGCGACCTGGCGCAGTTAAGCAGCGCAGTAT	-AGCCCAGCAGCCCAGTAGACCCCGCCAAAATCGCTACTTGCAGCGCAATAGTCCGCCAGTTGG								
SZMC 13066	CAAGGGGCGACCTGGCGCAGTTAAGCGGCGCAGTAT	-AGCCCAGCAGCTTGATAGACCCCGCCAAAATCGCCACCTG	CAGCGCAATAGCCCGCCAGTTGG							
SZMC 13067	CAAGGGGCGACCTGGCGCAGTTAAGCAGCGCAGTAT	-AGCCCAGCAGCCCAGTAGACCCCGCCAAAATCGCTACTTGCAGCGCAATAGTCCGCCAGTTGG								
SZMC 13068	CAAGGGGCGACCTGGCGCAATTAAGCAGCGCAGTAT	-AGCCCAGCAGCCCAGTAGACCCCGCCGAAATCGCCACCTACAGCGCAATAGTCCGCCAGTTGG								
SZMC 13069	CAAGGGGCGACCTGGCGCGTTAAGCAGCGCAGTAT	-AGCCCAGCAGCCCAGTAGACCCCGCCAAAATCGCTACTTGCAGCGCAATAGTCCGCCAGTTGG								
SZMC 21168	CAAGGGGCGACCTGGCGCAGTTAAGCGGCGCAGTAT	-AGCCCAGCAGCTTGATAGACCCCGCCAAAATCGCCACCTG	CAGCGCAATAGCCCGCCAGTTGG							
SZMC 13070	CAAGGGGCGACCTGGCGCAGTTAAGCAGCGCAGTAT	-AGCCCAGCAGCCCAGTAGACCCCGCCAAAATCGCTACTTGCAGCGCAATAGTCCGCCAGTTGG								
SZMC 13071	CAAGGGGCGACCTGGCGCAATTAAGCAGCGCAGTAT	-AGCCCAGCAGCCCAGTAGACCCCGCCGAAATCGCCACCTACAGCGCAATAGTCCGCCAGTTGG								
SZMC 13073	CAAGGGGCGACCTGGCGCAATTAAGCAGCGCAGTAT	-AGCCCAGCAGCCCAGTAGACCCCGCCGAAATCGCCACCTACAGCGCAATAGTCCGCCAGTTGG								
SZMC 13074	CAAGGGGCGACCTGGCGCAGTTAAGCAGCGCAGTAT	-AGCCCAGCAGCCCAGTAGACCCCGCCAAAATCGCTACTTGCAGCGCAATAGTCCGCCAGTTGG								
SZMC 13075	CAAGGGGCGACCTGGCGCAATTAAGCAGCGCAGTAT	-AGCCCAGCAGCCCAGTAGACCCCGCCGAAATCGCCACCTACAGCGCAATAGTCCGCCAGTTGG								
SZMC 13063	CAAGGGGCGACCTGGCGCGTTAAGCAGCGCAGTAT	-AGCCCAGCAGCCCAGTAGACCCCGCCAAAATCGCTACTTGCAGCGCAATAGTCCGCCAGTTGG								
SZMC 13078	CAAGGGGCGACCTGGCGCAATTAAGCAGCGCAGTAT	-AGCCCAGCAGCCCAGTAGACCCCGCCGAAATCGCCACCTACAGCGCAATAGTCCGCCAGTTGG								
SZMC 13079	CAAGGGGCGACCTGGCGCAATTAAGCAGCGCAGTAT	-ATCCCAAGCAGCCCAGTAGACCCCGCCGAAATCGCCACCTACAGCGCAATAGTCCGCCAGTTGG								
SZMC 13080	CAAGGGGCGACCTGGCGCAGTTAAGCGGCGCAGTAT	-AGCCCAGCAGCTTGATAGACCCCGCCAAAATCGCCACCTG	CAGCGCAATAGCCCGCCAGTTGG							
SZMC 21169	CAAGGGGCGACCTGGCGCAGTTAAGCGGCGCAGTAT	-AGCCCAGCAGCTTGATAGACCCCGCCAAAATCGCCACCTG	CAGCGCAATAGCCCGCCAGTTGG							
SZMC 13081 B.spicifera	CAAGGGGCGACCTGGCGCAATTAAGCAGCGCAGTAT	-AGCCCAGCAGCCCAGTAGACCCCGCCGAAATCGCCACCTACAGCGCAATAGTCCGCCAGTTGG								
SZMC 13082 B.spicifera*	CAAGGGGCGACCTGGCGCAATTAAGCAGCGCAGTAT	-AGCCCAGCAGCCCAGTAGACCCCGCCGAAATCGCCACCTACAGCGCAATAGTCCGCCAGTTGG								
SZMC 13083 B.hawaiiensis	CAAGGGGCGACCTGGCGCGTTAAGCAGCGCAGTAT	-AGCCCAGCAGCCCAGTAGACCCCGCCAAAATCGCTACTTGCAGCGCAATAGTCCGCCAGTTGG								
SZMC 13084 B.hawaiiensis	CAAGGGGCGACCTGGCGCGTTAAGCAGCGCAGTAT	-AGCCCAGCAGCCCAGTAGACCCCGCCAAAATCGCTACTTGCAGCGCAATAGTCCGCCAGTTGG								
SZMC 13085 B.hawaiiensis*	CAAGGGGCGACCTGGCGCGTTAAGCAGCGCAGTAT	-AGCCCAGCAGCCCAGTAGACCCCGCCAAAATCGCTACTTGCAGCGCAATAGTCCGCCAGTTGG								
SZMC 13086 B.australiensis*	CATGGGGCGACCTAGCGCTAATAAAA	-AGCGTAGTATAAGCCAGCAGCCGACAGATCCCGCCAAAATCGCCACCTG	CAGCGCAATAGTCCGCCAGTTAG							
SZMC 13087 B.australiensis	CAAGGGGCGACCTGGCGCAATTAAGCAGCGCAGTAT	-AGCCCAGCAGCCCAGTAGACCCCGCCGAAATCGCCACCTACAGCGCAATAGTCCGCCAGTTGG								
SZMC 13088 B.spicifera	CAAGGGGCGACCTGGCGCAATTAAGCAGCGCAGTAT	-AGCCCAGCAGCCCAGTAGACCCCGCCGAAATCGCCACCTACAGCGCAATAGTCCGCCAGTTGG								
SZMC 13041 Co.australiensis	CATGGGGCGACCTAGCGCTAATAAAA	-AGCGTAGTATAAGCCAGCAGCCGACAGATCCCGCCAAAATCGCCACCTACAGCGCAATAGTCCGCCAATTAG								
SZMC 13042 Co.hawaiiensis	CAAGGGGCGACCTGGCGCGTTAAGCAGCGCAGTAT	-AGCCCAGCAGCCCAGTAGACCCCGCCAAAATCGCTACTTGCAGCGCAATAGTCCGCCAGTTGG								
SZMC 13044 Co.australiensis	CATGGGGCGACCTAGCGCTAATAAAA	-AGCGTAGTATAAGCCAGCAGCCGACAGATCCCGCCAAAATCGCCACCTACAGCGCAATAGTCCGCCAGTTAG								
SZMC 13056 Co.hawaiiensis	CAAGGGGCGACCTGGCGCGTTAAGCAGCGCAGTAT	-AGCCCAGCAGCCCAGTAGACCCCGCCAAAATCGCTACTTGCAGCGCAATAGTCCGCCAGTTGG								
SZMC 13057 Co.spicifer	CAAGGGGCGACCTGGCGCAATTAAGCGGCGCAGTAT	-AGCCCAGCAGCCCAGTAGACCCCGCCAAAATCG								
SZMC 13012 B.sorokiniana										

	4210	4220	4230	4240	4250	4260	4270	4280	4290	4300
									
SZMC 13058	TTGCCCAACAGCAGACACTTGACTA	CAAGTAACTCAATTAGCACTGAGAGGCTGCCTGCGATCCATATTGGATCTGAGCTGCTCTTCTCAT								
SZMC 13059	TTGCCCAACAGCAG	CTAAACCGGCCGCAAGTAGCTGATTTTATTGAGCGGCAGCCAGAGACCCAACTGGATCTCAGCTGCTCTTCTCAT								
SZMC 13060	TTGCCCAACAGCAG	GCCACATAGCCGCAAAATACTCAATCAGCACTGAGACGCTGCCTGAGACCCATATTGGATCTCAGGTGCTCTTCTCAT								
SZMC 13061	TTGCCCAACAGCAG	GCCACATAGCCGCAAAATACTCAATTAGC-CTGAGACGCTGCCTGAGACCCATATTGGATCTCAGGTGCTCTTCTCAT								
SZMC 13062	TTGCCCAACAGCAGACACTTGACTA	CAAGTAACTCAATTAGCACTGAGAGGCTGCCTGCGATCCATATTGGATCTGAGCTGCTCTTCTCAT								
SZMC 13064	TTGCCCAACAGCAG	GCCACATAGCCGCAAAATACTCAATCAGCACTGAGACGCTGCCTGAGACCCATATTGGATCTCAGGTGCTCTTCTCAT								
SZMC 13065	TTGCCCAACAGCAG	GCCACATAGCCGCAAAATACTCGATTAGCACTGAGACGCTGCCTAAGACCCATATTGGATCTCAGGTGCTCTTCTCAT								
SZMC 13066	TTGCCCAACAGCAGACACTTGACTA	CAAGTAACTCAATTAGCACTGAGAGGCTGCCTGCGATCCATATTGGATCTGAGCTGCTCTTCTCAT								
SZMC 13067	TTGCCCAACAGCAG	GCCACATAGCCGCAAAATACTCAATTAGCACTGAGACGCTGCCTAAGACCCATATTGGATCTCAGGTGCTCTTCTCAT								
SZMC 13068	TTGCCCAACAGCAG	GCCACATAGCCGCAAAATACTCAATCAGCACTGAGACGCTGCCTGAGACCCATATTGGATCTCAGGTGCTCTTCTCAT								
SZMC 13069	TTGCCCAACAGCAG	GCCACATAGCCGCAAAATACTCAATTAGCACTGAGACGCTGCCTGAGACCCATATTGGATCTCAGGTGCTCTTCTCAT								
SZMC 21168	TTGCCCAACAGCAGACACTTGACTA	CAAGTAACTCAATTAGCACTGAGAGGCTGCCTGCGATCCATATTGGATCTGAGCTGCTCTTCTCAT								
SZMC 13070	TTGCCCAACAGCAG	GCCACATAGCCGCAAAATACTCGATTAGCACTGAGACGCTGCCTAAGACCCATATTGGATCTCAGGTGCTCTTCTCAT								
SZMC 13071	TTGCCCAACAGCAG	GCCACATAGCCGCAAAATACTCAATCAGCACTGAGACGCTGCCTGAGACCCATATTGGATCTCAGGTGCTCTTCTCAT								
SZMC 13073	TTGCCCAACAGCAG	GCCACATAGCCGCAAAATACTCAATCAGCACTGAGACGCTGCCTGAGACCCATATTGGATCTCAGGTGCTCTTCTCAT								
SZMC 13074	TTGCCCAACAGCAG	GCCACATAGCCGCAAAATACTCAATTAGCACTGAGACGCTGCCTAAGACCCATATTGGATCTCAGGTGCTCTTCTCAT								
SZMC 13075	TTGCCCAACAGCAG	GCCACATAGCCGCAAAATACTCAATCAGCACTGAGACGCTGCCTGAGACCCATATTGGATCTCAGGTGCTCTTCTCAT								
SZMC 13063	TTGCCCAACAGCAG	GCCACATAGCCGCAAAATACTCAATTAGCACTGAGACGCTGCCTGAGACCCATATTGGATCTCAGGTGCTCTTCTCAT								
SZMC 13078	TTGCCCAACAGCAG	GCCACATAGCCGCAAAATACTCAATCAGCACTGAGACGCTGCCTGAGACCCATATTGGATCTCAGGTGCTCTTCTCAT								
SZMC 13079	TTGCCCAACAGCAG	GCCACATAGCCGCAAAATACTCAATCAGCACTGAGACGCTGCCTGAGACCCATATTGGATCTCAGGTGCTCTTCTCAT								
SZMC 13080	TTGCCCAACAGCAGACACTTGACTA	CAAGTAACTCAATTAGCACTGAGAGGCTGCCTGCGATCCATATTGGATCTGAGCTGCTCTTCTCAT								
SZMC 21169	TTGCCCAACAGCAGACACTTGACTA	CAAGTAACTCAATTAGCACTGAGAGGCTGCCTGCGATCCATATTGGATCTGAGCTGCTCTTCTCAT								
SZMC 13081 B.spicifera	TTGCCCAACAGCAG	GCCACATAGCCGCAAAATACTCAATCAGCACTGAGACGCTGCCTGAGACCCATATTGGATCTCAGGTGCTCTTCTCAT								
SZMC 13082 B.spicifera*	TTGCCCAACAGCAG	GCCACATAGCCGCAAAATACTCAATCAGCACTGAGACGCTGCCTGAGACCCATATTGGATCTCAGGTGCTCTTCTCAT								
SZMC 13083 B.hawaiiensis	TTGCCCAACAGCAG	GCCACATAGCCGCAAAATACTCAATTAGCACTGAGACGCTGCCTGAGACCCATATTGGATCTCAGGTGCTCTTCTCAT								
SZMC 13084 B.hawaiiensis	TTGCCCAACAGCAG	GCCACATAGCCGCAAAATACTCAATTAGCACTGAGACGCTGCCTGAGACCCATATTGGATCTCAGGTGCTCTTCTCAT								
SZMC 13085 B.hawaiiensis*	TTGCCCAACAGCAG	GCCACATAGCCGCAAAATACTCAATTAGCACTGAGACGCTGCCTGAGACCCATATTGGATCTCAGGTGCTCTTCTCAT								
SZMC 13086 B.australiensis*	TTGCCCTAACAGCAG	GCCGATAGCCGCAAAATACTCAATCAGCACTGAGACGCTGCCTTTGACCCATACCTGGGTCTCAGGTGCTCTTCTCAT								
SZMC 13087 B.australiensis	TTGCCCAACAGCAG	GCCACATAGCCGCAAAATACTCAATCAGCACTGAGACGCTGCCTGAGACCCATATTGGATCTCAGGTGCTCTTCTCAT								
SZMC 13088 B.spicifera	TTGCCCAACAGCAG	GCCACATAGCCGCAAAATACTCAATCAGCACTGAGACGCTGCCTGAGACCCATATTGGATCTCAGGTGCTCTTCTCAT								
SZMC 13041 Co.australiensis	TTGCCCTAACAGCAG	GCCGATAGCCGCAAAATACTCAATCAGCACTGAGACGCTGCCTTTGACCCATACCTGGGTCTCAGGTGCTCTTCTCAT								
SZMC 13042 Co.hawaiiensis	TTGCCCAACAGCAG	GCCACATAGCCGCAAAATACTCAATTAGCACTGAGACGCTGCCTAAGACCCATATTGGATCTCAGGTGCTCTTCTCAT								
SZMC 13044 Co.australiensis	TTGCCCTAACAGCAG	GCCGATAGCCGCAAAATACTCAATCAGCACTGAGACGCTGCCTTTGACCCATACCTAGGTCTCAGGTGCTCTTCTCAT								
SZMC 13056 Co.hawaiiensis	TTGCCCAACAGCAG	GCCACATAGCCGCAAAATACTCAATTAGCACTGAGACGCTGCCTAAGACCCATATTGGATCTCAGGTGCTCTTCTCAT								
SZMC 13057 Co.spicifer										
SZMC 13012 B.sorokiniana										

		4410	4420	4430	4440	4450	4460
SZMC	13058	TCGACGACACC	TCCGGTTC	CCCCA	CC	AAACCCCA	CCAAAACCAA-AGCCAG
SZMC	13059	TCCGCGGTTC	TCT	CCCCGT	CCCCCA	CC	AAAA
SZMC	13060		C	TCCGGT	CCCCCA	CCAACAC	TGCCAAAC
SZMC	13061		C	TCCGGT	CCCCCA	CCT	
SZMC	13062	TCGACGACACC	TCCGGT	TCCC	A	CC	AAACCCCA
SZMC	13064		C	TCCGGT	CCCCCA	CCAACAC	TGCCAAAC
SZMC	13065		C	TCCGGT	CCCCCA	CCTGAATGAT	CA
SZMC	13066	TCGACGACACC	TCCGGT	TCCCCA	CC	AAACCCCA	CCAAAACCAAAGCCAG
SZMC	13067		C	TCCGGT	CCCCCA	CCTGAATGAT	CA
SZMC	13068		C	TCCGGT	CCCCCA	CCAACAC	TGCCAAAC
SZMC	13069		C	TCCGGT	CCCCCA	CCTATATGAT	CAAAAC
SZMC	21168	TCGACGACACC	TCCGGT	TCCCCA	CC	AAACCCCA	CCAAAACCAA-AGCCAG
SZMC	13070		C	TCCGGT	CCCCCA	CCTGAATGAT	CA
SZMC	13071		C	TCCGGT	CCCCCA	CCAACAC	TGCCAAAC
SZMC	13073		CTTCCGGT	CCCCCA	TCCAACAC	TGTCAAAAC	
SZMC	13074		C	TCCGGT	CCCCCA	CCTGAATGAT	CAAAAC
SZMC	13075		C	TCCGGT	CCCCCA	CCAACAC	TGCCAAAC
SZMC	13063		C	TCCGGT	CCCCCA	CCTATATGAT	CAAAAC
SZMC	13078		C	TCCGGT	CCCCCA	CCAACAC	TGCCAAAC
SZMC	13079		C	TCCGGT	CAACCA	CCAACAC	TGCCAAAC
SZMC	13080	TCGACGACACC	TCCGGT	TCCCCA	CC	AAACCCCA	CCAAAACCAA-AGCCAG
SZMC	21169		C	TCCGGT	CCCCCA	CCAACAC	TGCCAAAC
SZMC	13081	B.spicifera		C	TCCGGT	CCCCCA	CCAACAC
SZMC	13082	B.spicifera*		C	TCCGGT	CCCCCA	CCAACAC
SZMC	13083	B.hawaiiensis		C	TCCGGT	CCCCCA	CCTATATGAT
SZMC	13084	B.hawaiiensis		C	TCCGGT	CCCCCA	CCTATATGAT
SZMC	13085	B.hawaiiensis*		C	TCCGGT	CCCCCA	CCTATATGAT
SZMC	13086	B.australiensis*		C	TCCGGT	GCCCCA	CCTACATAGCC
SZMC	13087	B.australiensis		C	TCCGGT	CCCCCA	CCAACAC
SZMC	13088	B.spicifera		C	TCCGGT	CCCCCA	CCAACAC
SZMC	13041	Co.australiensis		C	TCCGGT	GCCTCA	CCTATATAGCT
SZMC	13042	Co.hawaiiensis		C	TCCGGT	CCCCCA	CCTAAATGAT
SZMC	13044	Co.australiensis		C	TCCGGT	GCCTCA	CCTACATAGCC
SZMC	13056	Co.hawaiiensis		C	TCCGGT	CCCCCA	CCTAAATGAT
SZMC	13057	Co.spicifer					
SZMC	13012	B.sorokiniana					